



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Datos Preliminares sobre la Epitelización con Membrana
Amniótica en Úlceras complejas de Pie Diabético**

**Dña. Mónica Rodríguez Valiente
2018**



UNIVERSIDAD DE MURCIA FACULTAD DE MEDICINA

Doctorando: D^a Mónica Rodríguez Valiente

Directores: Dr. Patricio José Alcaraz Lorente

Dr. Gregorio Castellanos Escrig

Dra. Ana María García Hernández

Murcia, 2018



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dr. PATRICIO JOSE ALCARAZ LORENTE, profesor asociado de Universidad del Área de Ciencias de la Salud en el Departamento de Cirugía, Pediatría, Obstetricia y Ginecología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“DATOS PRELIMINARES SOBRE LA EPITELIZACIÓN CON MEMBRANA AMNIÓTICA EN ULCERAS COMPLEJAS DE PIE DIABÉTICO”**, realizada por D^a. MÓNICA RODRÍGUEZ VALIENTE, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de Julio de 2018

A handwritten signature in brown ink on a light-colored background.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dr. GREGORIO CASTELLANOS ESCRIG, profesor titular de Universidad del Área de Ciencias de la Salud en el Departamento de Cirugía, Pediatría, Obstetricia y Ginecología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“DATOS PRELIMINARES SOBRE LA EPITELIZACIÓN CON MEMBRANA AMNIÓTICA EN ULCERAS COMPLEJAS DE PIE DIABÉTICO”**, realizada por D^a. MÓNICA RODRÍGUEZ VALIENTE, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de Julio de 2018


Prof. G. Castellanos



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dra. Ana María García Hernández facultativo especialista en el Servicio de Hematología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“DATOS PRELIMINARES SOBRE LA EPITELIZACIÓN CON MEMBRANA AMNIÓTICA EN ULCERAS COMPLEJAS DE PIE DIABÉTICO”**, realizada por D^a. MÓNICA RODRÍGUEZ VALIENTE, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de Julio de 2018

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del Dr. Ana María García Hernández, con trazos fluidos y entrecruzados.

ÍNDICE GENERAL

1	AGRADECIMIENTOS.....	14
2	INTRODUCCIÓN	20
2.1	DIABETES MELLITUS.....	20
2.1.1	Concepto y Epidemiología	20
2.1.2	Etiopatogenia.....	21
2.1.3	Fisiopatología	21
2.1.4	Clínica y diagnóstico	23
2.1.5	Tratamiento	24
2.1.6	Complicaciones.....	26
2.2	PIE DIABETICO	39
2.2.1	Epidemiología.....	39
2.2.2	Definición del Síndrome del Pie Diabético (DFS).....	40
2.2.3	Fisiopatología	40
2.2.4	Úlceras.....	43
2.2.5	Clasificación.....	43
2.2.6	Localizaciones de las úlceras en Pie Diabético.....	47
2.2.7	Isquemia	48
2.2.8	Infección	51
2.2.9	Aspectos clínicos generales.....	55
2.2.10	Exploración de las úlceras	58
2.2.11	Aspectos terapéuticos (Cura ambiental, Terapia de Presión Negativa Tópica (TPNT), Cámara hiperbárica, Terapia celular)	60
2.2.12	Valoración clínica del riesgo y prevención	61
2.3	HERIDAS COMPLEJAS.....	69
2.4	PROCESO DE CICATRIZACIÓN EN EL PACIENTE DIABÉTICO.....	69
2.5	LA MEMBRANA AMNIOTICA: CARACTERÍSTICAS Y POTENCIAL TERAPEÚTICO	70

2.5.1	Origen y características	70
2.5.2	Propiedades de la MA como tejido completo	74
2.5.3	Propiedades de los tipos celulares aislados en la MA	82
2.5.4	Aplicaciones clínicas de la MA.....	86
3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	88
4	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	90
5	MATERIAL Y MÉTODOS	91
5.1	Obtención de la MA	91
5.2	Procesamiento de la MA	93
5.3	Viabilidad del producto MA	95
5.4	Selección de los pacientes	95
5.5	Procedimientos de estudio y tratamiento con MA	96
5.6	Objetivos del estudio. Variables recogidas	101
5.7	Metodología de evaluación del tratamiento. Cronograma	102
5.8	Metodología estadística.....	104
6	RESULTADOS.....	106
6.1	Resultados de la viabilidad celular.....	106
6.2	Resultados de las características de las úlceras y evolución de los pacientes	109
6.3	Resultados de los microorganismos presentes en los cultivos realizados durante el tratamiento con MA	120
6.4	Resultados estadísticos.....	121
6.5	Resultados de los seguimientos de las úlceras en los pacientes	121
7	DISCUSIÓN Y COMENTARIOS.....	125
7.1	Reducción del área de la herida.....	125
7.2	Disminución del tejido desvitalizado	126
7.3	Regulación del exudado	127
7.4	Reducción del dolor	127
7.5	Disminución de la infección.....	128

7.6	Regulación del tejido de granulación	129
7.7	Angiogénesis	131
7.8	Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).....	133
7.9	Acontecimientos adversos.....	133
7.10	Otros aspectos a destacar:	134
7.11	Dificultades asociadas al procedimiento	136
7.12	Limitaciones.....	137
8	CONCLUSIONES	138
9	BIBLIOGRAFIA	139
10	ANEXOS.....	153

1 AGRADECIMIENTOS

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se llega a su fin. A pesar de que ha sido un camino largo y a veces tedioso, en el que conforme caminas, piensas que van retirando la meta, pero al final “todo esfuerzo tiene su recompensa”.

En primer lugar, mi agradecimiento a mi tutor y directores, que han hecho posible la realización de esta tesis.

A mi director el Dr. Alcaraz por haber compartido conmigo su enorme conocimiento y motivarme para seguir adelante. Este es en gran parte su trabajo.

Mi más sincera gratitud a mi director y tutor el Prof. Castellanos por su enorme generosidad, quien se ha implicado de forma inmejorable y ha gastado su tiempo y esfuerzo en hacer posible esta tesis.

Especialmente quisiera mostrar mi agradecimiento a mi directora la Dra. Ana M^a García quien ha sido y es mi apoyo, mi confidente y mi mejor amiga, de quien he aprendido que desde la humildad y el trabajo duro se puede llegar a cualquier parte. No cambies nunca amiga.

Mi agradecimiento al Servicio de Hematología, por mi crecimiento tanto profesional como personal bajo la dirección del Prof. J.M. Moraleda de quien he aprendido la importancia del esfuerzo y la constancia. Muchas gracias por motivarme y apoyarme en todas mis decisiones.

Al Dr. Miguel Blanquer y a la Dra. Carmen de Insausti, que me contagiaron su pasión por las células, la investigación, y me iniciaron en esta línea de trabajo.

Al Dr. Francisco José Nicolás, por su ayuda y conocimientos sobre los aspectos moleculares de las heridas.

De la misma forma, quiero agradecer a todas y cada una de las personas que han estado presentes durante esta etapa, y aquellas que estuvieron y que ahora, por diversos motivos, están en otros lugares.

A todos mis compañeros del Servicio de Hematología y Terapia Celular del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca: Paqui, Darío, Javier, Carmen, Virginia, Lola, Cira, Mar, Sandra, Miriam, Flori, Cristina, Natalia y Sergio, con quienes he compartido buenos y malos momentos y a los que les debo tanto.

A Sonia Almansa por su habilidad, destreza y trato inmejorable hacia el paciente y por haberme ayudado y facilitado todo, y también al resto de compañeros/as de la Unidad de Heridas y Pie Diabético que han aportado su granito de arena.

Y sobre todo a los pacientes por ser parte primordial en todo estudio y por su confianza en nosotros.

Finalmente, todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia, padres, hermanas, y en particular de la ayuda de mi marido y mis hijos a quienes les he robado tanto tiempo. Y por último, agradecer a mis ángeles del cielo “mi madre y mi abuela”, que seguro que estarían muy orgullosas de mí y desde algún lugar hoy están sonriendo. Gracias de todo corazón, esta tesis es también vuestro premio.

Este trabajo, se ha englobado en la línea de investigación:

- Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular.
- Programa de Doctorado en Integración y Modulación de Señales en Biomedicina. - Grupo de Investigación multidisciplinar [E037-14].

- Y ha sido financiado con la ayuda para la realización de proyectos de investigación en cuidados de enfermería (FFIS17/CE/01). Línea estratégica de investigación de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (carm): diabetes.

Merece una mención especial en este trabajo, la ingente labor profesional y personal llevada a cabo por la Dra. Francisca Iniesta quien participó en la puesta en marcha de:

- La Sala Blanca del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Los protocolos de recogida de la Membrana Amniótica, de Ensayos Clínicos y Usos Compasivos
- La relación con la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

Sin toda esta ayuda, este trabajo no hubiera llegado a “buen puerto”

Has sido y eres un importante eslabón de nuestro grupo de investigación. Gracias una vez más.

ABREVIATURAS

AACE: Asociación Americana de Endocrinología Clínica

ADA: Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association)

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

AGE: Producto final de la Glicosilación avanzada (Advanced Glycosylation End product)

AWMA: Asociación Europea del Manejo de Heridas (EWMA: European Wound Management Association)

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico

CCR: Receptor de citoquinas CC

CD34+: Células precursoras hematopoyéticas

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CLI: Isquemia Crítica Crónica de Miembro Inferior

CMN: Células Mononucleadas

CMV: Citomegalovirus

DFI: Infección de Pie Diabético (Diabetic Foot Infection)

DM: Diabetes Mellitus

DMSO: Dimetilsulfoxido

EAP: Enfermedad Arterial Periférica (PAD: Peripheral arterial disease)

EAPO: Enfermedad Arterial Periférica Oclusiva

EBV: Virus Epstein Barr

EMD: Edema Macular Diabético

EMG: Electromiografía

EO: Estrés Oxidativo

FDA: Food and Drug Administration

GMP: Buenas Practicas de Fabricación (Good Manufacturing Practice)

GNE: Glicosilación no Enzimática

hAEC: Células epiteliales del amnios humano

hAMSC: Células mesenquimales estromales amnióticas humanas

HbA1c: Hemoglobina Glicosilada A1c

HBV: Virus de la Hepatitis B

HCV: Virus de la Hepatitis C

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte growth factor)

HGFR: Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte growth factor)

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

HLA: Antígeno leucocitario humano (Human leukocyte antigen)

HTLV: Virus linfotrópico de células T humanas

IFN: Interferón

IFN- γ : Interferón gamma

IL-8: Interleucina-8

IL-10: Interleucina-10

IL-15: Interleucina-15

IL-TR: Inmunoglobulin Like Transcript Receptor

ITB: Índice Tobillo Brazo

IWGDF: International Working Group of the Diabetic Foot

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos (Keratinocyte Growth Factor)

MA: Membrana Amniótica

MO: Médula ósea

NGF: Factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor)

NK: Natural Killer

NPD: Neuropatía Periférica Diabética

NT-3: Neurotrofina-3

Oct-4: Octamer-binding transcription factor 4

PaCo2: Presión Parcial de Dióxido de Carbono

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PEDIS: Perfusión Extensión Profundidad Infección Sensibilidad

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor)

PD-L: Ligandos de muerte celular programados (programmed death ligands)

RD: Retinopatía Diabética

RM: Resonancia Magnética

SSEA: Antígenos embrionarios en estadio específico (stage specific embryonic antigen)

STRO-1: Marcador de células mesenquimales

TRA: Tumor Rejection Antigen

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

TC: Tomografía Computarizada

TcPo2: Presión de Oxígeno Transcutáneo

TGF- β : Factor de crecimiento Transformante Beta (Transforming Growth Factor Beta)

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TPNT: Terapia de Presión Negativa Tópica

TRA: Antígeno humano marcador del carcinoma embrionario (tumor rejection antigen)

UPC: Unidad de Producción Celular

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)

vWF: Factor Von Willebrand

2 INTRODUCCIÓN

2.1 DIABETES MELLITUS

2.1.1 Concepto y Epidemiología

La Diabetes Mellitus (DM) se define como un conjunto de metabolopatías que tienen en común altos niveles de glucemia, por déficit de insulinemia o alta resistencia celular a su efecto, o hiperproducción de glucosa con disfunciones en el control metabólico de lípidos, proteínas e iones.

En el concepto de DM debemos tener presente que, aunque hay una afectación de todo el organismo, las manifestaciones clínicas más evidentes son vasculares, y entre ellas destacan las microangiopáticas (como oftalmopatía, nefropatía y polineuritis) y las macroangiopáticas (como la arteriopatía obstructiva crónica multisistémica y multisegmentaria, con afectación osteomuscular y presencia de úlceras e infecciones de partes blandas) [1].

La DM se ha convertido en un gran problema de salud pública en todo el mundo, la prevalencia global está incrementándose llegando a alcanzar el 8,5% en 2016, lo que corresponde a 387 millones de pacientes. Su incidencia en aumento y su elevada morbimortalidad la convierten en una amenaza para los sistemas de salud de los estados actuales y una carga para el paciente y su familia [2].

En cuanto a España, los resultados del estudio di@bet.es realizado en 2018 demuestran que el 13,8% de los españoles mayores de 18 años tiene diabetes tipo 2, lo que equivale a más de 5,3 millones de personas [3].

2.1.2 Etiopatogenia

Tanto la DM tipo 1 como la tipo 2 comparten como característica común la hiperglucemia, por disminución y deterioro progresivo de la masa de células en los islotes pancreáticos o por disminución en la eficacia de los mecanismos de señalización.

En la DM tipo 1, existe un daño a las células pancreáticas por ataque selectivo del sistema inmunitario que conlleva la generación excesiva y prolongada de radicales libres [4].

La DM tipo 2, es una enfermedad crónica progresiva que se caracteriza por la resistencia periférica a la insulina en el músculo esquelético, hígado, tejido adiposo y por el fracaso de las células beta pancreáticas para compensar esta resistencia [5].

2.1.3 Fisiopatología

La primera manifestación clínica que presenta una persona para ser diagnosticada como diabética es la hiperglucemia. La hiperglucemia mantenida puede dañar de forma irreversible el endotelio vascular por diferentes mecanismos:

1. Un incremento en la concentración de glucosa intracelular que implica cambios cuantitativos y cualitativos a nivel de la membrana celular.
2. Un aumento en el proceso de glicosilación no enzimática (GNE)
3. Un incremento del estrés oxidativo (EO) causado por la glicosilación y la autooxidación de la glucosa.

El efecto de la hiperglucemia induce al daño vascular, condicionado por el flujo excesivo de glucosa a través de varias vías metabólicas no dependientes de insulina para su transporte.

La glicosilación no enzimática en el caso de la DM se encuentra patológicamente acelerada, sobre todo en periodos de descompensación metabólica, y trae consigo que las proteínas modifiquen su estructura, sus propiedades físico-químicas y sus funciones biológicas.

La hemoglobina fue la primera proteína glicosilada estudiada y el porcentaje de glicosilación se utiliza en la práctica médica como un índice de control glucémico del paciente.

La hiperglucemia *per se* tiene un efecto nocivo sobre las enzimas que participan en el sistema antioxidante de defensa. Por otra parte, los productos finales de la glicosilación no enzimática están relacionados con una disfunción endotelial que produce en el vaso sanguíneo un incremento en la permeabilidad, una disminución en la antitrombogenicidad, una disfunción en la actividad fibrinolítica y el incremento de la adhesión de plaquetas y monocitos, lo que provoca una superficie endotelial permeable y

trombogénica. Se ha descrito que la disfunción endotelial precede al debut de las lesiones tanto micro como macrovasculares [6].

2.1.4 Clínica y diagnóstico

Confirmar el diagnóstico sindrómico de la DM no siempre es sencillo. La forma de presentación clínica de la enfermedad no es única, y aunque la mayoría de los pacientes muestran síntomas característicos secundarios a la hiperglucemia mantenida durante un tiempo más o menos prolongado antes de que la enfermedad se sospeche, otros son diagnosticados en una fase evolutiva más temprana mediante el cribado selectivo de determinados grupos de riesgo, encontrándose completamente asintomáticos en el momento del diagnóstico. Por este motivo, la Asociación Americana de Diabetes (ADA), ha establecido una serie de criterios diagnósticos consensuados, basados en la determinación directa de la glucemia o, más recientemente, en su estimación indirecta a través de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) y en la presencia de síntomas osmóticos característicos (poliuria, polidipsia y pérdida de peso, entre otros) [7].

En cuanto a los rangos analíticos que presentan estos pacientes, se considera dentro del rango normal a valores de glicemia en ayunas entre 70 y 100 mg/dl y en situación postprandrial, inferiores a 140 mg/dl con alimentación normal. Existe un estado intermedio entre normal y diabetes: se considera diabetes a valores de glucemia superiores a 126 mg/mL y entre 100 y 126 mg/dl en ayunas no se puede hacer el

diagnóstico; a este estado se le denomina intolerancia a la glucosa o glucemia alterada en ayunas.

Los criterios diagnósticos de DM son los siguientes:

- Glucemia al azar ≥ 200 mg/dl en presencia de síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia o pérdida de peso inexplicada).
- Glucemia en ayunas (al menos durante 8 horas) ≥ 126 mg/dl.
- Glucemia ≥ 200 mg/dl a las 2 horas tras la sobrecarga oral con 75 g de glucosa (Sobrecarga Oral de Glucosa).
- Hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5\%$

En cuanto a la DM tipo 1 es una enfermedad heterogénea que produce manifestaciones clínicas tardíamente, en general de forma aguda o subaguda, cuando ya se han destruido la mayoría de las células pancreáticas. En la gran mayoría de los casos, dicha destrucción está mediada por una reacción autoinmune de tipo celular frente a una o más proteínas de las células [7,8].

2.1.5 Tratamiento

Medidas generales

El tratamiento debe estar encaminado a descender los niveles de glucemia:

1. Evitar descompensaciones agudas, cetoacidosis o síndrome hiperosmolar

2. Aliviar los síntomas: (poliuria / polidipsia / astenia / pérdida de peso con polifagia)
3. Minimizar el riesgo de desarrollo o progresión de retinopatía, nefropatía y/o neuropatía diabética
4. Evitar las hipoglucemias
5. Mejorar el perfil lipídico de los pacientes
6. Disminuir la mortalidad

Educación diabetológica

En muchos casos, conseguir niveles de glucemia óptimos requiere un programa de entrenamiento por parte del paciente en el control de su enfermedad, basado en determinaciones frecuentes de glucemia capilar, consejo nutricional, práctica regular de ejercicio, régimen de insulina adaptado al estilo de vida, instrucción para prevenir y tratar las hipoglucemias y evaluación periódica de los resultados obtenidos.

Recomendaciones nutricionales

El tratamiento dietético es un pilar fundamental en el manejo de la diabetes y en muchas ocasiones es probablemente la única intervención necesaria. En líneas generales, la dieta debe ir orientada hacia la consecución y mantenimiento de un peso aceptable y de unos niveles óptimos de glucosa, lípidos y tensión arterial. La proporción de nutrientes no será distinta a la recomendada en la población general, debiendo comer suficientes

hidratos de carbono en cada comida y evitar los azúcares solubles y sus derivados por su rápida absorción que eleva la glucemia postprandial. Se recomienda que el total de calorías consumidas a lo largo del día se repartan en 4 ó 5 comidas.

Tratamiento farmacológico

Para el tratamiento farmacológico de la diabetes, se dispone de insulina en sus distintas presentaciones y antidiabéticos orales (sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la alfa-glucosidasa, la repaglinida y las tiazolidinedionas).

La insulina debe emplearse siempre en el tratamiento de la DM tipo 1, y en un número importante de pacientes con DM tipo 2. Es una proteína de 51 aminoácidos encuadrados en dos cadenas que hoy se obtiene por ingeniería genética [9].

2.1.6 Complicaciones

La hiperglucemia mantenida asociada con los llamados Advanced Glycosylation End product (AGE), es la causa de la aparición a medio y largo plazo de las complicaciones vasculares que se representan en la tabla 1.

<i>MACROANGIOPATICAS</i>	<i>MICROANGIOPATICAS</i>
- Enfermedad cardiovascular - Enfermedad cerebrovascular - Arteriopatía periférica	- Retinopatía diabética - Nefropatía diabética - Neuropatía diabética - Pie diabético

Tabla 1. Complicaciones por la hiperglucemia mantenida en la DM. (Elaboración propia)

- Complicaciones macroangiopáticas

a) Enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes con DM y pueden dar lugar a múltiples complicaciones, incluyendo la enfermedad arterial coronaria y la hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca [10].

Los estudios de Framingham [11] demuestran que los pacientes con DM presentan de dos a cuatro veces más probabilidades de desarrollar enfermedades cardiovasculares, y tienen tres veces más alta tasa de mortalidad global en comparación con aquellos sin DM [12].

También, se ha demostrado que el riesgo de fallo cardíaco se incrementa en pacientes con DM incluso después de estabilizar la enfermedad arterial coronaria y la hipertensión arterial [12].

La Diabetes conduce a alteraciones estructurales y funcionales cardíacas en el miocardio, siendo ampliamente reconocido que la hipertrofia de los cardiomiocitos, la inflamación cardíaca, la fibrosis, el aumento de la apoptosis, y las anormalidades metabólicas están presentes en la miocardiopatía diabética [12].

b) Enfermedad cerebrovascular

El concepto de enfermedad cerebrovascular se refiere a todo trastorno en el cual un área del encéfalo se afecta de forma transitoria o permanente por una isquemia o hemorragia, estando uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados por un proceso patológico. Los pacientes diabéticos tienen más riesgo de padecer enfermedad cerebrovascular que la población no diabética. El término ictus representa de forma genérica un grupo de trastornos que incluyen: el infarto cerebral, la hemorragia cerebral y la hemorragia subaracnoidea [13,14].

c) Arteriopatía periférica

La Enfermedad Arterial Periférica (EAP) es ahora el término preferido para definir la obstrucción parcial o completa de una o más arterias periféricas. Otros términos utilizados para esta condición son la enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica oclusiva, y la enfermedad arterial de las extremidades inferiores.

Los pacientes diabéticos con enfermedad arterial periférica tienen 5 veces más probabilidad de tener una amputación y triplican sus probabilidades de mortalidad [15].

Su distribución anatómica es algo diferente de la población no diabética, con mayor afectación de las arterias distales a la rodilla en diabéticos frente a pacientes no diabéticos [15].

El síntoma más común de la EAP es la claudicación intermitente que se define como dolor o calambres en la zona gemelar, muslos o nalgas que aparece de forma reproducible al caminar y se alivia con el reposo [16].

En 1954, R. Fontaine [17] presentó una sencilla clasificación para los pacientes con isquemia crónica de miembros inferiores que se ha aplicado desde entonces de forma general. Posteriormente, Rutherford [18] propuso otra clasificación con 7 categorías (0 a 6) para estratificar más adecuadamente a estos pacientes.

En los pacientes diabéticos, esta claudicación intermitente puede verse disminuida en mayor o menor grado por la presencia de neuropatía.

Pruebas diagnósticas de la Enfermedad Arterial Periférica

Existen múltiples pruebas diagnósticas para valorar la presencia y la severidad de la EAP, entre las que cabe destacar el índice tobillo-brazo (ITB) (tabla2), la palpación de pulsos, la presión de oxígeno transcutáneo, el índice dedo-brazo, las determinaciones de la presión segmentaria, y los métodos morfológicos: (eco-doppler, angio-TC, angio-RM, arteriografía) que se deben utilizar para planear la estrategia quirúrgica si se va a realizar una revascularización [19].

- Índice Tobillo Brazo (ITB)

El ITB es la relación de la presión arterial sistólica en el tobillo con respecto al brazo. Un valor anormalmente bajo de este índice es indicativo de una aterosclerosis en la pierna. Un ITB ≤ 0.90 se utiliza comúnmente en la práctica clínica y epidemiológica para diagnosticar la enfermedad arterial periférica, tanto sintomática como asintomática [15].

INDICE ITB	SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD
>1,4	Probable calcificación
>1	Probable no enfermedad arterial
0,81-1	Leve enfermedad arterial
0,5-0,8	Enfermedad arterial moderada
<0,5	Enfermedad severa
<0,3	Isquemia crítica

Tabla 2. Valores indicativos de la prueba ITB modificada de Mo Al-Qaisi et al [20]

- Palpación de pulsos (figura 1)

Los tres elementos fundamentales de la exploración vascular son inspección, palpación y auscultación. La inspección permite apreciar trayectos arteriales hiperpulsátiles (dilataciones o elongaciones arteriales).



Figura 1. Palpación la arteria tibial posterior en paciente con arteriopatía diabética. Consulta de Pie Diabético Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).

- Presión de oxígeno transcutáneo (TcPo₂)

Es una técnica sencilla que mide la cantidad de oxígeno que llega a la piel, lo que permite la cuantificación objetiva del grado de isquemia de las extremidades. Se ha informado de que un nivel TcPo₂ mayor de 30 mm Hg es un fuerte predictor de la cicatrización de heridas espontánea en pacientes con úlceras de pie diabético [16,21].

- El índice dedo-brazo

Se utiliza para casos de arteriopatía severa o aquellos en los que el paciente presenta una calcificación arterial importante ITB ($>1,3$). Es igual que el ITB, solo que, en vez de tomar la presión sistólica del tobillo, se toma la presión del dedo [22].

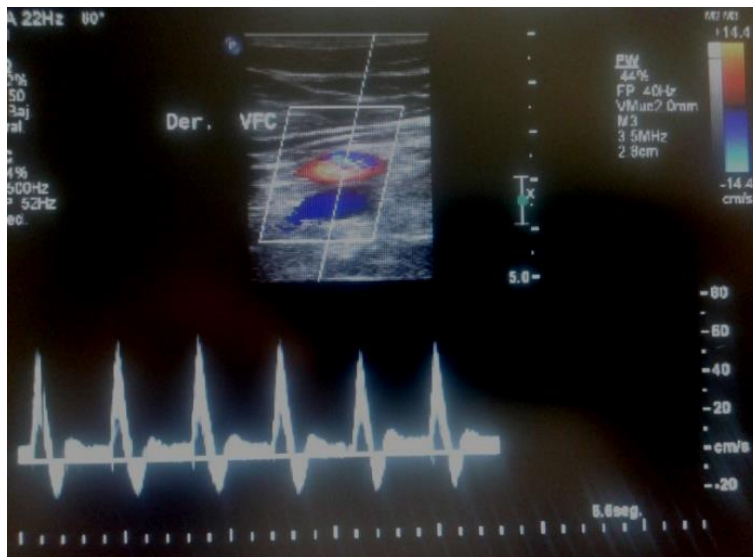
En las extremidades inferiores suele observarse atrofia muscular, ausencia de vello y, en fases avanzadas, eritema en declive o «pie de langosta». En estadios muy avanzados de la enfermedad pueden aparecer lesiones ulceradas, necróticas o de gangrena como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Paciente con escara necrótica en el talón, isquemia grado IV Fontaine. Imagen tomada en la consulta de Pie Diabetico Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).

- Ecografía-Doppler

Combinándola con el estudio con Doppler nos permite estimar la gravedad de la obstrucción [23].



- Angiografía vascular mediante tomografía computarizada o resonancia magnética y arteriografía convencional

La angiografía mediante tomografía computarizada y resonancia magnética permiten obtener imágenes de alta resolución de la anatomía vascular que pueden determinar con precisión el grado y la extensión de las obstrucciones arteriales (figura 4).

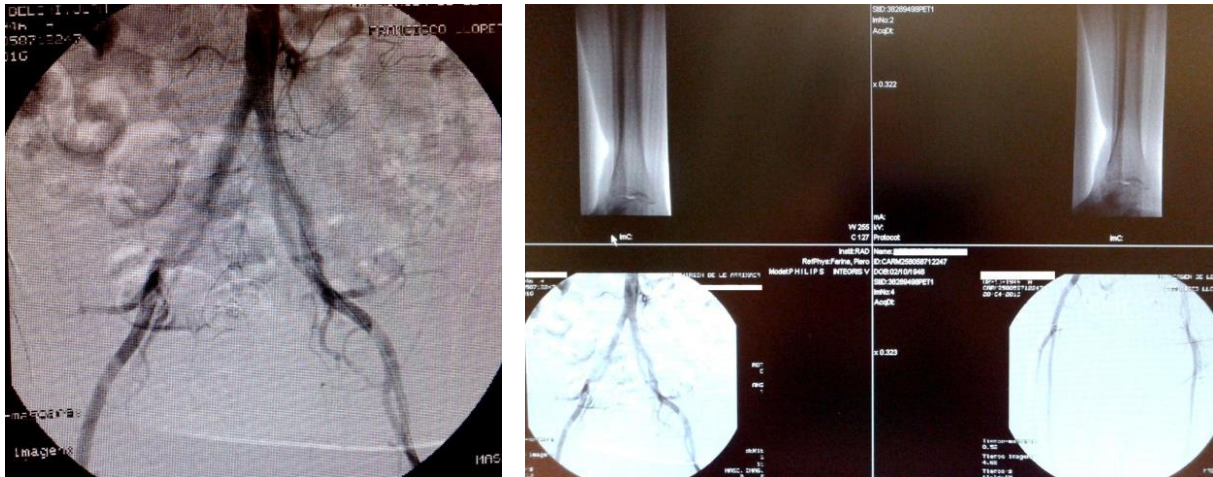


Figura 4. Arteriografía de Miembro Inferior en paciente con úlcera en Pie Diabético con permeabilidad de ilíacas, femorales y poplíteas. Imagen tomada del Servicio de Angiología Vascular del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).

Complicaciones microangiopáticas

Retinopatía Diabética

La retinopatía hace referencia a cualquier enfermedad no inflamatoria que afecte a la retina. Las retinopatías más comunes son la retinopatía diabética, que es una

complicación de la diabetes, la retinopatía hipertensiva complicación de la hipertensión arterial y la retinosis pigmentaria que es una enfermedad de origen genético.

La retinopatía diabética es una complicación microvascular común de la DM, que se produce en casi todos los pacientes con DM tipo 1 y el 80% tipo 2 después de un período de 20 años. La principal causa de pérdida de visión en estos pacientes y uno de los más comunes en adultos de avanzada edad es el Edema Macular Diabético (EMD) [24].

La Retinopatía Diabética (RD) es una enfermedad potencialmente devastadora y es la causa más común de ceguera.

Nefropatía Diabética

Es una de las complicaciones más frecuentes en aproximadamente el 50% de los pacientes diagnosticados. Es el resultado de una disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular caracterizada en su fase inicial por una hiperfiltración glomerular que en fases más avanzadas origina una hipertrofia glomerular y un engrosamiento de la membrana basal, originando una lesión renal que conduce a una insuficiencia renal en los pacientes diabéticos [25].

El creciente número de personas con diabetes ha tenido un importante impacto en la prevalencia de la nefropatía diabética [9].

Los métodos que se utilizan como marcadores clínicos de la nefropatía diabética en la práctica real son: la evaluación de la función renal en términos de la tasa estimada de filtración glomerular (EGFR), y la estimación de daño renal en los términos de la albuminuria [26].

Recientes directrices, [25] recomiendan un objetivo de hemoglobina glucosilada <7.0 % (53 mmol / mol), para prevenir o retrasar la progresión de la microvascular complicaciones de la diabetes, incluyendo la nefropatía diabética [27].

Neuropatía Diabética

En el síndrome de la Neuropatía Periférica Diabética (NPD) las fibras nerviosas más largas se ven afectadas en un grado mayor que las más cortas porque la velocidad de conducción nerviosa se desacelera en proporción a la longitud del nervio. En el examen clínico, las extremidades inferiores generalmente revelan sensaciones anormales de vibración, presión, dolor, temperatura y percepción. Las investigaciones sobre los cambios morfológicos en la neuropatía periférica diabética se han centrado principalmente en los nervios periféricos, como la degeneración axonal, desmielinización y patología de las células Schwann. Desafortunadamente, los mecanismos internos de la neuropatía periférica diabética siguen siendo desconocidos [9].

Se define NPD como: "la presencia de síntomas y / o signos de disfunción del nervio periférico en pacientes con diabetes después de excluir otras causas" [28]. Por lo

tanto, la NPD debe ser diagnosticada por evaluación clínica, ya que la ausencia de síntomas no siempre implica la ausencia de signos.

Esta patología se produce en los pacientes con DM tipo 1 y DM tipo 2 a causa de la hiperglucemia crónica. Su inicio suele ser insidioso, por lo que muchos pacientes permanecen asintomáticos durante un largo período de tiempo, y las quejas del paciente o un examen de detección de rutina a menudo levantan sospechas.

El inadecuado control de la glucosa en pacientes con DM tipo 1 sugiere que la hiperglucemia es el principal impulsor de la lesión del nervio, mientras que el control de esta consecuencia en pacientes con DM tipo 2 sugiere que otros factores además de la hiperglucemia son importantes, incluyendo la obesidad, la hipertensión, bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad y la hipertrigliceridemia, que posiblemente contribuye a la lesión del nervio y, a menudo se asocia con la diabetes [29].

La neuropatía puede ser asintomática, sintomática o incapacitante y presentarse clínicamente como: polineuropatía simétrica distal (sensitiva), polineuropatía asimétrica proximal (motora), mononeuropatía, radiculopatía, mononeuropatía múltiple o neuropatías mixtas [30].

La neuropatía distal simétrica inicialmente dolorosa o indolora, es de tipo evolutivo y la más común de las complicaciones tardías de la DM, aunque la frecuencia depende de la duración de la diabetes y del control metabólico [30,20].

Los métodos diagnósticos auxiliares para examinar la sensibilidad son:

- El monofilamento de Semmes-Weinstein 5.07-10g, filamento de nylon que va a ejercer una presión de 10 gramos justo en el momento que se dobla al tocar la piel, que es el umbral de protección al dolor en el pie. El filamento se aplicará en 10 zonas del pie (Figura 5) perpendicularmente a la superficie de la piel durante no más de 1.5 segundos, hasta que se doble, en ese momento está aplicando una fuerza de 10 g, el paciente deberá decir si lo ha detectado, la prueba tiene una sensibilidad 91%, especificidad 86%, valor predictivo positivo 39%, valor predictivo negativo 95%.

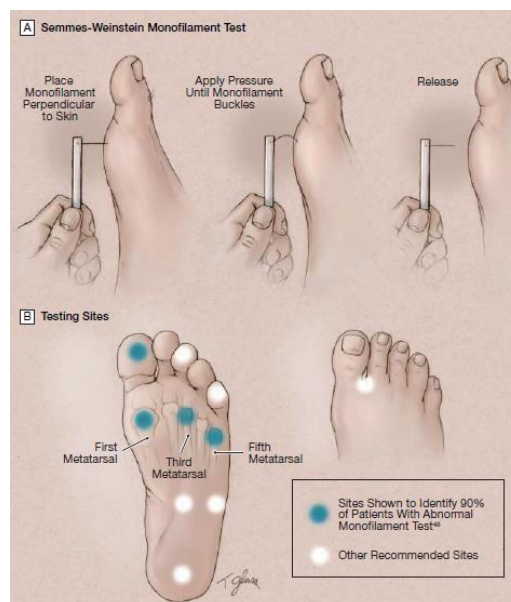


Figura 5. El monofilamento Semmes-Weinstein 5,07 consiste en un mango de plástico que soporta un hilo de nylon. El filamento se coloca perpendicular a la piel, y se aplica presión hasta que la hebilla del filamento se doble. El filamento se mantiene en su lugar durante aproximadamente 1 segundo. La incapacidad para percibir la fuerza (10g) que se aplica es asociada con neuropatía. El test se realiza en diez sitios para evaluar todos los dermatomas del pie mejorando así la sensibilidad y especificidad en comparación con la prueba realizada en un solo punto del pie. Tomada de Singh, N. 2005 [31].

- El diapasón de 128 ciclos por segundo y con orejuelas, se explora la sensibilidad profunda para determinar la presencia de apalestesia o hipopalestesia, colocando el instrumento en las salientes óseas. También deberá examinarse el sentido de posición de cada uno de los puntos analizados (sensibilidad profunda) [20, 30].

La sospecha diagnóstica se establece tras la anamnesis y exploración física, y mediante la electromiografía (EMG) se confirma el diagnóstico y se controla la evolución de la enfermedad [32].

2.2 PIE DIABETICO

2.2.1 Epidemiología

Entre las personas con diagnóstico de DM, el riesgo de desarrollar una úlcera en el pie se estima en un 15%. La incidencia anual basada en la población oscila entre el 1,0% y el 4,1% y la prevalencia entre el 4% y el 10%, lo que sugiere que la incidencia de por vida puede ser tan alta como la enfermedad [33].

La enfermedad vascular periférica puede alcanzar hasta el 25% de los casos, quienes tienen un riesgo 30 veces mayor de sufrir una amputación [33-35].

De todas las complicaciones de la DM, el pie diabético es uno de las más devastadoras y costosas [36].

Uno de los resultados de la neuropatía es el desarrollo de un pie insensible, lo que aumenta el riesgo de ulceración. La degeneración de la inervación sensorial conduce a insensibilidad al dolor causado por las úlceras, heridas o infecciones, las cuales son las principales causas de la pérdida de la extremidad.

2.2.2 Definición del Síndrome del Pie Diabético (DFS)

Se define, según la Organización Mundial de la Salud, como " Ulceración del pie (en sentido distal desde el tobillo, incluyendo este) en el paciente diabético asociado con la neuropatía y diferentes grados de isquemia e infección". Representa una seria complicación de la DM de larga evolución que conlleva a amputaciones, discapacidad y reducción de la calidad de vida [34].

2.2.3 Fisiopatología

El inicio de la alteración clínica del Pie Diabético radica en el descontrol metabólico, por otro lado la misma hiperglucemia sostenida provoca alteración en la vasculatura endoneural, disminuyendo el flujo y ocasionando hipoxia neural.

La afectación sensitiva suele ser asintomática. Produce inicialmente pérdida de la sensación de dolor y temperatura, y posteriormente de la percepción de vibración y de la sensibilidad superficial. Debido a ella los diabéticos no son capaces de detectar los cambios de temperatura, el exceso de presión producido por zapatos ajustados o cualquier

otro traumatismo mantenido. La afectación motora provoca atrofia y debilidad de los músculos intrínsecos del pie, perdiéndose la función de estabilización de las articulaciones metatarsofalángicas e interfalángicas, produciendo una contractura dinámica de los flexores y extensores largos, provocando dedos en martillo y dedos en garra, que conducen a la protrusión de las cabezas de los metatarsianos y a una distribución anormal de las cargas en el pie [35].

Por lo tanto, existen unos factores predisponentes, neuropatía asociada en mayor o menor grado a macro y microangiopatía, que provocan un pie vulnerable, de alto riesgo; unos factores precipitantes o desencadenantes, generalmente un traumatismo mecánico, que producen una *úlcer*a o necrosis, y unos factores agravantes que determinan el pronóstico de la extremidad, que son la infección, que provocará daño tisular extenso, la isquemia que retrasará la cicatrización y la neuropatía que evitará el reconocimiento tanto de la lesión como del factor precipitante (figura 6) [35].

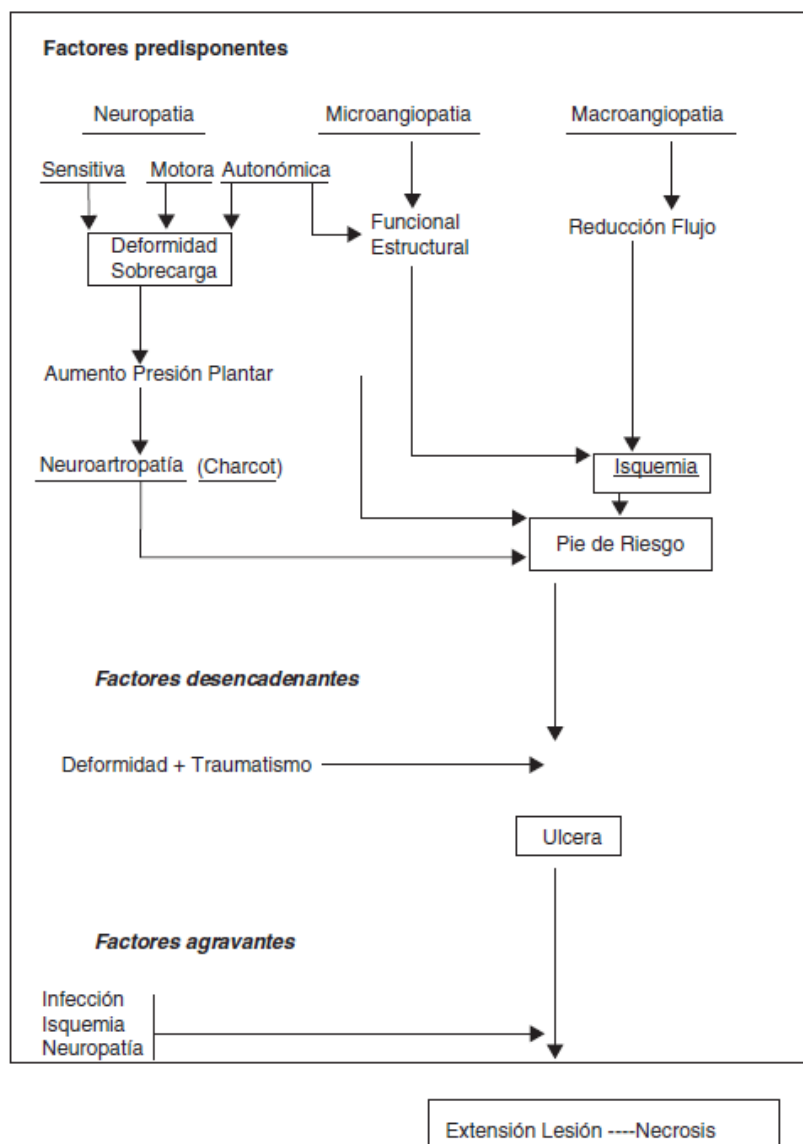


Figura 6. Mecanismo de producción de la úlcera de Pie Diabético. Tomada de Blanes, 2012 [35].

2.2.4 Úlceras

La ulceración del pie es el precursor más común de amputación de miembros inferiores entre los pacientes diabéticos. La presencia de ulceración del pie se considera un importante riesgo para la morbilidad, la mortalidad y la discapacidad apoyada por el hecho de que alrededor del 80% de las amputaciones no traumáticas son causadas por la presencia de diabetes y el 85% de estas amputaciones son precedidos por una úlcera en el pie [34,35].

2.2.5 Clasificación

Las úlceras diabéticas puede ser clasificadas en función de la gravedad como: leves (superficiales y limitadas en tamaño y profundidad), moderadas (más profundo o más extensa) o graves (acompañado de signos sistémicos o perturbaciones metabólicas), o en los grados utilizando la escala Wagner y Armstrong (Tabla 3) [37].

	Wagner 0	Wagner 1	Wagner 2	Wagner 3	Wagner 4	Wagner 5
Armstrong A	Lesiones pre o post ulcerativas	Úlcera superficial	Tendón, articulación o capsula	Hueso y articulación	Gangrena y articulación	Gangrena requiere desarticulación
Armstrong B	Con infección	Con infección	Con infección	Con infección	Con infección	Con infección
Armstrong C	Con isquemia	Con isquemia	Con isquemia	Con isquemia	Con isquemia	Con isquemia
Armstrong D	Con infección e isquemia	Con infección e isquemia	Con infección e isquemia	Con infección e isquemia	Con infección e isquemia	Con infección e isquemia

Tabla 3. Clasificación Wagner-Armstrong. Tomada de Beckmann, KH. [37]

La clasificación de Texas ("Escala Texas") de tipo bidimensional diseñada por Lavery y Armstrong en 1996 [38] y posteriormente validada en 1998 [39], es un sistema de clasificación donde las lesiones son estadiadas en base a dos criterios principales: **profundidad y existencia de infección/isquemia** (tabla 4) [39].

	0	1	2	3
	Pre o post lesión ulcerativa	Herida superficial en dermis	Dermis, tejido subcutáneo, musculo, tendón o capsula	Penetra en hueso
A	No infectada o isquémica 0%	No infectada o isquémica 0%	No infectada o isquémica 0%	No infectada o isquémica N/A
B	Infectada 12,5%	Infectada 8,5%	Infectada 28,6%	Infectada 92%
C	Isquémica 25%	Isquémica 20%	Isquémica 25%	Isquémica 100%
D	Infectada e isquémica 50%	Infectada e isquémica 50%	Infectada e isquémica 100%	Infectada e isquémica 100%

Tabla 4. Clasificación de úlceras de Pie Diabético de la Universidad de Texas. A medida que avanza a través del eje X (profundidad) y abajo de la Y eje (etapa), aumenta el riesgo de amputación. Tomada de Hesman, G. [39]

En 2003, el International Working Group of the Diabetic Foot (IWGDF) [40] introdujo su sistema de clasificación PEDIS identificando 5 categorías:

P (Perfusión) E (Extensión/Tamaño) D (Profundidad/Pérdida de tejido) I (Infección) S (Sensibilidad).

El International Consensus on the Diabetic Foot & Practical and Specific Guidelines on the Management and Prevention of the Diabetic Foot 2011 [40,41] siguen apoyando el uso del sistema PEDIS (tabla 5) como sistema de clasificación de las úlceras de Pie Diabético. Para cada categoría dentro de este sistema se ofrece una medida de gradación que describe la gravedad dentro de la misma.

	Perfusión	Extensión	Profundidad	Infección	Sensibilidad
GRADO 1	No hay signos ni síntomas de enfermedad en pie. Pulso palpable, ITB* de 0,9-1, TBI<0,6, TcPo*>60mmHg	Debe medirse en cm2 tras el desbridamiento. El borde externo de la úlcera debe medirse desde la piel intacta que rodea la úlcera.	Úlcera de espesor total superficial, que no penetra en ninguna estructura mas allá de la dermis.	No síntomas de infección	No se detecta pérdida de sensibilidad protectora en el pie afectado.
GRADO 2	Presencia de claudicación intermitente. ITB < 0,9 pero con presión en el tobillo < 50mmHg o ITB< 0,6 pero con presión sistólica en el dedo del pie > 30mmHg o TcPo 20-30mmHg		Úlcera profunda que penetra por debajo de la dermis en estructuras subcutáneas, afectando a fascia, músculo o tendón.	Dolor Calor Eritema >0,5-2cm Secreción purulenta	Ausencia de sensibilidad a la presión, determinada con un monofilamento de 10gr, en 2 de 3 puntos en el lado plantar del pie, o Ausencia de sensibilidad vibratoria (determinada por diapason de 128Hz), o umbral de vibración > 25V.
GRADO 3	Isquemia crítica del miembro definida por: Presión sistólica en el tobillo <50mmHg o Presión sistólica en el dedo del pie <30mmHg o TcPo <30mmHg		Afectación de todas las siguientes estructuras del pie, incluidos el hueso y/o la articulación (hueso expuesto, alcance del hueso).	Eritema >2cm mas los síntomas presentes en el grado 2	

GRADO 4	Temperatura >38 o 90 pulsaciones/min >20 respiraciones /min PaCO2<32mmHg Recuento leucocitario >12.000 o<4000				
------------------------------	---	--	--	--	--

Tabla 5. Graduación de las úlceras según el sistema PEDIS. *ITB: Índice Tobillo Brazo,*PcPO2: Presión Transcutánea de Oxígeno, PaCO2: Presión Parcial de Dióxido de Carbono. Modificado de Schaper, N.C. 2004 [40]

2.2.6 Localizaciones de las úlceras en Pie Diabético

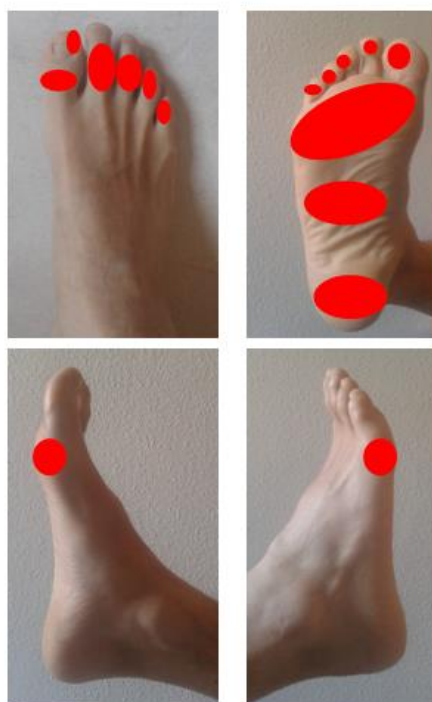


Figura 7. Imagen de las zonas de localización de úlceras en Pie Diabético (Elaboración propia)

Las úlceras (figura 7), pueden localizarse en cualquier parte del pie siendo más común en la zona plantar y en las cabezas metatarsales por hiperqueratosis previa (neuropáticas y charcot), en el talón o en la primera y quinta cabeza de los metatarsianos (isquemia) [42]. Las úlceras digitales en dedos en garra y en martillo son comunes por traumatismos, y las úlceras en el calcáneo, por decúbito y presión mantenida.

Las úlceras que aparecen en la parte posterior de la articulación interfalángica de dedos en garra o en martillo, en la zona más prominente de juanetes, en los dedos de los pies del 1ª y 5ª, en los márgenes laterales, o en la parte posterior del pie, se deben a la presión y fricción repetida en esta área por lo general inducida por el calzado. En las zonas en las que se ha producido una protuberancia ósea (úlceras neuropáticas) la lesión aparecerá en la planta del pie (mal perforante plantar), en la enfermedad de las articulaciones de Charcot, con la deformación plantar en balancín, las úlceras ocurren debido al aumento de la presión generada al caminar [35] (Figura 8).

2.2.7 Isquemia

El concepto de isquemia crítica crónica de los miembros inferiores representa la etapa final de la Enfermedad Arterial Periférica Oclusiva (EAPO), se refiere a un estado de insuficiencia arterial que reduce la presión de perfusión distal hasta tal punto que la

microcirculación y el aporte de nutrientes en el flujo de sangre que llega a los tejidos está gravemente disminuido [35,42].

La Isquemia critica del miembro inferior, tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos, se define por cualquiera de los dos criterios siguientes:

- Dolor isquémico persistente y recurrente en reposo, que requiere regularmente analgesia durante más de dos semanas con una presión sistólica en el tobillo de 50 mmHg y / o presión sistólica en el dedo de 30 mmHg;
- Ulceración o gangrena del pie o de los dedos de los pies, con una presión sistólica en el tobillo de 50 mmHg o la presión sistólica del dedo del pie de 30 mmHg.

Las ulceraciones que se producen en el contexto de la isquemia severa relacionada con EAPO, se encuentran en la extremidad del miembro inferior y en los dedos de los pies y los pies. Clínicamente, tienen un borde inactivo, una pálida base necrótica o están cubiertas de material de fibrina. Mientras que el dolor isquémico crónico en reposo tiene una presentación estandarizada la úlcera isquémica y la gangrena del dedo del pie son mucho más difíciles de identificar claramente como lesiones atribuibles a EAPO [35,42].

En esquema, se encuentran tres situaciones. La insuficiencia arterial es grave, y la lesión isquémica de la piel se produce de forma espontánea o después de un trauma menor. La insuficiencia arterial es moderada pero lo suficientemente grave como para

poner en peligro el proceso de curación de cualquier lesión de la piel. Y por último, la EAPO está presente, pero sólo como una condición asociada, sin relación causal con lesiones de la piel.

En el Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II) de 2007 [43]. Se presentaron las siguientes recomendaciones:

Recomendación 16: Definición clínica de la Isquemia Crítica Crónica de las extremidades (CLI) como que debe ser utilizada para todos los pacientes con dolor isquémico en reposo, con úlceras o gangrena atribuible objetivamente a enfermedad arterial oclusiva. El término CLI implica cronicidad y es debe distinguirse de isquemia del miembro aguda.

Recomendación 19: El diagnóstico de la isquemia crítica de las extremidades es un diagnóstico clínico, pero debe ser apoyado por pruebas objetivas como un dolor isquémico en reposo, que se produce con mayor frecuencia por debajo de una presión en el tobillo de 50 mmHg o una presión del dedo del pie menos de 30 mmHg.

Más de 70% de los pacientes diabéticos con úlceras curadas, desencadenan nuevas úlceras en los 5 años siguientes, lo que explica la alta frecuencia de amputaciones entre 10- 15.000 / año, precedidas por una ulceración no reconocida [44].

No todas las heridas diabéticas son isquémicas, pero en comparación con las úlceras neuropáticas o mixtas, tienen un peor pronóstico, con una la supervivencia a 5 años del 40% (65% para las úlceras neuropáticas) y una tasa de amputación del 28%.

Una de las características fundamentales de la diabetes es el predominio de la enfermedad difusa y extensa a lo largo de las arterias tibiales subpoplitea ya sea en forma aislada o junto con lesiones proximales obstructivas femoropoplíteas [45].

2.2.8 Infección

Se considera que una úlcera del pie diabético está infectada cuando tiene supuración, o están presentes dos o más signos inflamatorios (eritema, calor, dolor, induración o sensibilidad). El diagnóstico de una osteomielitis (infección ósea) subyacente, requiere pruebas de imagen compatibles.

El puerto de entrada de una infección en pie diabético se produce casi siempre en pacientes que han sufrido una lesión aguda en el pie con la solución de continuidad de la barrera dérmica.

La primera fase del diagnóstico es establecer si la úlcera es neuropática o neuroisquémica. Una causa importante de infecciones, a menudo graves de la extremidad inferior se origina por sobreinfección de bacterias cocos gram positivos presentes en fisuras de la piel y espacios interdigitales, a su vez infectados por dermatofitos [46].

En pacientes diabéticos con neuropatía y pérdida sensitiva, las heridas penetrantes en la planta del pie pueden pasar totalmente desapercibidas, hasta que los signos de infección aparecen más tarde. Estas lesiones se deben principalmente a agresiones térmicas o por iatrogenia (intervenciones podológicas). También pueden deberse a lesiones interdigitales de la onicomycosis u onicocriptosis.

La isquemia, es otra de las causas de las úlceras del Pie Diabético, que a menudo afecta a los dedos del pie y el talón. La infección de estas úlceras progresa rápidamente y con frecuencia representa un grave riesgo de amputación. La reacción inflamatoria es inadecuada, ya que su capacidad de vasodilatación, la formación de edema y la infiltración de leucocitos está disminuida.

Dependiendo de la lesión inicial y su localización anatómica, la infección puede evolucionar en función de varias formas clínicas. Para la piel y de tejidos blandos se distinguen dos formas: la superficial (dermis y epidermis), como celulitis y erisipela; y la profunda, tales como fascitis necrosante situada en el tejido celular subcutáneo y mionecrosis y abscesos que se dan en la fascia profunda y el músculo. También puede extenderse a las articulaciones subyacentes (artritis) y al hueso (osteomielitis).

En presencia de un Pie Diabético caliente e hinchado con lesiones ulceradas, es necesario establecer el diagnóstico diferencial entre neuroartropatía de Charcot aguda, y unas condiciones infecciosas, incluyendo celulitis, absceso plantar u osteomielitis [47].

La osteomielitis puede estar presente con frecuencia en pacientes con infección de moderada a grave en el pie diabético. Es poco probable que la herida sane si no se identifica y se trata de forma adecuada cualquier osteomielitis subyacente [48].

Todas las úlceras crónicas en el tiempo terminan siendo invadidas por microorganismos que forman parte de la microbiota de la piel circundante (*Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp), y posteriormente de cualquier otra fuente.

Según las recientes directrices de la Diabetic Foot Infection Classification Schemes: IDSA/International Working Group on the Diabetic Foot [49] se define la infección grave como la presencia de infección local asociada con signos de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica [49]. (Tabla 6)

DESCRIPCIÓN CLÍNICA	IDSA	IWGDF
Herida sin purulencia o cualquier manifestación de la inflamación no infectada ≥ 2 manifestaciones de la inflamación (purulencia o eritema , dolor , sensibilidad, calor , o induración) ; cualquier celulitis o eritema se extiende ≤ 2 cm alrededor de la úlcera , y la infección se limita a la piel o tejidos subcutáneos superficiales ; no hay complicaciones locales o sistémicas de enfermedad	No infectada	1
La infección en un paciente sistémicamente bien y metabólicamente estable pero tiene de ≥ 2 cm ; linfangitis ; extendido por debajo de la fascia ; tejido profundo absceso; gangrena; músculos, tendones , articulaciones o afectación de la médula	Leve	2
Paciente que demuestra signos de respuesta inflamatoria sistémica síndrome se manifiesta por $\geq$ de los siguientes: $>38^{\circ}\text{C}$ Temperatura o , $<36^{\circ}\text{C}$ La frecuencia cardíaca >90 lpm Frecuencia respiratoria >20 respiraciones / minuto o PaCO_2 , <32 mmHg count $>12,000$ de glóbulos blancos o <4.000 células / microlitro o $\geq 10\%$ células inmaduras (bandas)	Moderado	3
La toxicidad sistémica también puede presentarse con la anorexia, escalofríos, hipotensión, confusión, vómitos, acidosis, hiperglucemia y / o azoemia. La presencia de isquemia crítica de las extremidades puede aumentar el nivel de gravedad.	Severo	4

Tabla 6. Sistema de clasificación de la infección del Pie Diabético según la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) y el Grupo de Trabajo Internacional sobre el Pie Diabético (IWGDF). Adaptado de Lipsky et al. 2012. [49]

La toma de una muestra adecuada y la recogida con un hisopo es decisiva para que el diagnóstico microbiológico (biopsia, legrado, aspiración percutánea). Si la infección es grave, con manifestaciones sistémicas, deberán tomarse hemocultivos.

Sobre la base de los resultados de los estudios disponibles, ningún fármaco solo o combinación de agentes parece ser superior a cualquier otro [50,51]. Desde la publicación del 2004 de las directrices de la Food and Drug Administration (FDA) se han aprobado 3 antibióticos (ertapenem, linezolid y piperacilina-tazobactam) específicamente para el tratamiento de las Diabetic Foot Infection (DFI) [49].

2.2.9 Aspectos clínicos generales

En la tabla 7 se muestran las recomendaciones para evaluar el Pie Diabético de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) con la Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AACE) y el Grupo de Trabajo Internacional del Pie Diabético (IWGDF).

Recomendación ADA y AACE La sensación de presión mediante con el monofilamento Semmes-Weinstein 5,07 (10 g) debe demostrarse al paciente en un sitio proximal (Por ejemplo, parte superior del brazo). En cuatro sitios (primera, tercera y quinta cabeza de los metatarsianos y la superficie plantar del hallux distal) deben ser probados en cada pie. Evitar las zonas de callos. Los pacientes deben cerrar sus ojos mientras se está probando. Pedir al paciente que responder "sí" o "no" e identificar el sitio correcto cuando se le pregunta si se aplica el monofilamento. La pérdida de la capacidad de detectar esta presión en uno o sitios anatómicos más se considera anormal. Recomendaciones IWGDF En primer lugar, aplicar el monofilamento en las manos del paciente (o el codo o la frente) para que él / ella sepa qué esperar. Los pacientes deben cerrar los ojos mientras se está realizando. Aplicar el monofilamento perpendicular a la superficie de la piel con la fuerza suficiente para hacer que el filamento se doble en tres sitios (primeras cabezas de los metatarsianos y quinto, y la superficie plantar del hallux distal) en ambos pies. Ejecutar la acción durante aproximadamente 2 segundos. No aplicar el filamento en un sitio de la úlcera, callos, cicatriz, o tejido necrótico. Preguntar al paciente si él / ella siente la presión aplicada ("sí" / "no") y, donde ("pie izquierdo" / "pie derecho"). Aplicar dos veces en el mismo sitio y se alternan con al menos una aplicación "fingida" en el que no se aplica ningún filamento (un total de tres preguntas por sitio). La percepción de protección está ausente con dos de cada tres respuestas incorrectas.
Recomendaciones ADA y AACE Percepción de la vibración usando un diapasón de ajuste de 128 Hz. Aplicar el diapasón sobre la punta del primer dedo de forma bilateral. La respuesta es anormal cuando el paciente pierde la sensación vibratoria y el examinador todavía lo percibe. Recomendaciones IWGDF En primer lugar, aplicar el diapasón en la muñeca del paciente (codo o la clavícula) para que él / ella sepa qué esperar. Los pacientes deben cerrar sus ojos mientras se están ejecutando. Aplicar el diapasón perpendicularmente con presión constante sobre una parte ósea en la cara dorsal de la falange distal del primer dedo. Repetir esta aplicación dos veces y se alternan con al menos una aplicación en el que el diapasón no vibre. La prueba es negativa ("en riesgo de ulceración") con dos de cada tres respuestas incorrectas.
Recomendaciones ADA y AACE Pruebas del umbral de percepción de la vibración (VPT). Coloque el lápiz táctil de la biotesiómetro sobre el hallux dorsal. Aumentar la amplitud hasta que el paciente puede detectar la vibración. La media de tres lecturas se toma sobre cada hallux. Valores de VPT > 25 V se consideran como anormales.
Recomendaciones ADA y AACE Sensación de pinchazo. Aplicar un dispositivo con una aguja afilada desechable estéril, se recomienda romper un aplicador de algodón para crear una punta relativamente aguda o usar la punta de un bolígrafo para realizar un pinchazo inmediatamente proximal a la uña del pie en la superficie dorsal de la hallux con la presión suficiente para deformar la piel. La incapacidad para percibir un pinchazo sobre cualquier hallux sería considerado como un resultado de la prueba anormal.
Recomendaciones ADA y AACE Reflejos del tobillo. Con el paciente, ya sea de rodillas o descansando sobre una mesa. El tendón de Aquiles se debe estirar hasta que el tobillo esté relajado antes de golpear con el martillo de reflejos. La ausencia total de reflejo tobillo se considera como un resultado anormal.

Tabla 7. Recomendaciones ADA, AACE e IWGDF. Modificada de Morey-Vargas, O.L. 2015[52]

La evaluación clínica del Pie Diabético recoge de forma sistemática aquellos datos relevantes de la historia, examen físico, e inspección del calzado como componente clave de la evaluación de los pacientes con diabetes (Tabla 8).

Es particularmente importante identificar una historia previa de úlceras o amputaciones, ya que ha sido reconocido como un fuerte factor de riesgo para posteriores complicaciones [53].

Las guías clínicas recomiendan que todos los pacientes con diabetes deban hacerse un examen minucioso de los pies al menos una vez al año, y con más frecuencia si se trata de un pie identificado de alto riesgo [54, 55].

HISTORIA CLINICA

Factores de riesgo en ulceración

Historia de las úlceras del pie, amputación, artropatía de Charcot, o infecciones previas en los pies.

Antecedentes de enfermedad arterial periférica previa.

Revascularización. Problemas de visión. Evaluación de los comportamientos que pueden aumentar el riesgo de lesión en el pie (por ejemplo, caminar descalzo).

Historia médica y social relevante

Determinar la duración de la diabetes, el control glucémico, y la presencia de otras complicaciones de la diabetes (por ejemplo, nefropatía, retinopatía).

El consumo de cigarrillos, la educación del pie anterior, y el aislamiento social.

Síntomas neuropáticos

Positivo (por ejemplo, hormigueo, ardor o sensaciones eléctricas. Dolor, especialmente nocturna). Negativo (por ejemplo, entumecimiento).

Síntomas de la enfermedad arterial periférica

La claudicación intermitente (es decir, dolor o calambres en las pantorrillas, los muslos o las nalgas que aparece con el ejercicio y se alivia con el reposo). Dolor en reposo (frecuentemente por medio de la parte delantera del pie y el peor en la noche con la elevación de las piernas).

Examen físico

Dermatológico

Controlar por áreas de eritema, calor, formación de ampollas, callos, hemorragia subcallus, callos, úlceras o signos de celulitis. Controlar por sequedad de la piel o fisuras. Edema o linfaedema. Compruebe si hay lesiones

interdigitales (por ejemplo, maceración, fisuras, o tinea pedis). Trastornos en las uñas del dedo del pie (por ejemplo, distrofia, onicomycosis, onicocriptosis, encarnada, o paroniquia).

Musculoesqueleticas

Evaluar la presencia de deformidades (por ejemplo, dedos en garra, dedos en martillo, cabezas de los metatarsianos prominentes, juanetes, o signos de artropatía de Charcot). Atrofia muscular intrínseca, contracturas del tendón de Aquiles, y la movilidad articular limitada (por ejemplo, menos de 50 ° de la falta de soporte de peso pasiva dorsiflexión del hallux).

Neurológico

Evaluar la presión usando un monofilamento de 10 g, percepción de la vibración (diapasón de 128 Hz o la medición de la percepción del umbral de vibración), pinchazo sensación de dolor, y los reflejos tendinosos profundos de Aquiles.

Vascular

La palpación de pulsos (femoral común, poplítea, tibial posterior y pedio) evaluar si "presente" o "ausente". Evaluar el aumento de palidez, rubor, gradiente de temperatura (extremidad ipsilateral y contralateral), frialdad de la piel o atrofia, la ausencia del crecimiento del pelo, onicodistrofia, o gangrena.

Evaluación del calzado

Evaluar para un ajuste (por ejemplo, demasiado estrecho, demasiado corto, no aptos para los dedos deformados), la profundidad de la zona de los dedos, los patrones de desgaste, cuerpos extraños, plantillas, ortésis.

Tabla 8. Evaluación clínica de los factores predisponentes en úlceras de Pie Diabético. Tomada de Morey Vargas, O.L. 2015 [52]

2.2.10 Exploración de las úlceras

Una vez instaurada la úlcera y en concordancia con la anamnesis, exploración física y pruebas complementarias, se valorarán los siguientes aspectos: el tipo de úlcera, tamaño, profundidad y localización, el color y estado del lecho, y si hay hueso expuesto; la presencia de signos clínicos de infección (dolor, rubor y calor), exudado, color y consistencia y el estado del borde de la herida y se realizará un examen semiológico completo para valorar su evolución y documentar las características de la úlcera (tabla 9).

Es útil tomar una imagen digital de las UPD en la primera visita, y periódicamente a partir de entonces para documentar el progreso y/o evolución.

El diagnóstico de la causa de la úlcera es esencial con el fin de planificar el tratamiento y mejorar la cicatrización de las la úlceras.

Úlceras Neuropáticas	Úlceras Neuroisquémicas
Ausencia de dolor Presencia de pulsos Apariencia de perforaciones Situado en la planta del pie Presencia de callosidades Pérdida de la sensibilidad Aumento del flujo (derivaciones arteriovenosas) Venas dilatadas Pie caliente y seco Aspecto rojo Deformidades de los huesos	Dolorosos Ausencia de pulso Márgenes irregulares En los dedos de los pies Ausencia de callosidades Hallazgos sensoriales Disminución del flujo sanguíneo Colapso de venas Pies fríos Aspecto pálido y cianótico No deformidades óseas

Tabla 9. Diagnóstico diferencial entre úlceras Neuropáticas y Neuroisquémicas. Elaboración propia.

En 1995, Grayson et al. [56] describieron una técnica clínica que utilizaron en pacientes diabéticos con infección en los pies que consiste en la exploración de la herida mediante la palpación del hueso con una sonda estéril acanalada. Su hallazgo más importante fue que la técnica *probe to bone* (PTB) tuvo un valor predictivo positivo del 89%, lo que lleva a la conclusión de que una prueba positiva hace generalmente innecesario estudios de imagen para el diagnóstico de osteomielitis [56,57].

2.2.11 Aspectos terapéuticos (Cura ambiental, Terapia de Presión Negativa Tópica (TPNT), Cámara hiperbárica, Terapia celular)

La European Wound Management Association (EWMA) propone el acrónimo **TIME** [58] que consta de cuatro componentes clave. **T**: Control del tejido no viable. **I**: Control de la inflamación y de la infección. **M**: Control del exudado. **E**: Estimulación de los bordes epiteliales.

Los componentes individuales de TIME ofrecen unas pautas para ayudar a los profesionales sanitarios a desarrollar un enfoque integral, mediante el cual pueda aplicarse el conocimiento científico básico para desarrollar estrategias que optimicen las condiciones de cicatrización de las heridas crónicas.

La técnica de desbridamiento a seguir (quirúrgico, cortante, enzimático o autolítico) dependerá de la localización, extensión y profundidad de la lesión.

La infección no es sólo la complicación más frecuente, sino una de las principales causas de su cronicidad. Los apósitos de plata o de cadexómero iodado han resultado útiles para disminuir la carga bacteriana.

Para control del exudado se utilizan los apósitos de alginato, hidrofibra de hidrocoloide y espumas de poliuretano. Las decisiones con respecto a qué tipo de apósito conviene aplicar deben basarse en los protocolos establecidos en cada centro y en las características y tipo de lesión.

2.2.12 Valoración clínica del riesgo y prevención

El médico general, el médico internista y el endocrinólogo tienen la oportunidad del manejo inicial del paciente con Pie Diabético, ya que en la mayoría de los casos y de acuerdo al nivel de atención, el paciente acudirá a alguno de ellos y tendrá que conocer los tratamientos adicionales a su especialidad para canalizar y tratar en conjunto oportunamente al paciente, además deberá hacer una buena clasificación y conseguir un buen control metabólico en el paciente.

En cuanto a la prevención hay que prestar especial atención a los factores predisponentes que dan lugar a un “*pie vulnerable*”, con un alto riesgo de lesión. Estos los clasificaremos en factores primarios, secundarios y nivel socioeconómico.

Factores primarios

Neuropatía

La neuropatía está implicada en la fisiopatología de la úlcera en un 80-90% de los casos. Esta neuropatía afecta a las fibras nerviosas sensitivas, motoras y autonómicas, produciendo diferentes manifestaciones a nivel del pie. La afectación sensitiva disminuye tanto la sensibilidad profunda (sentido de la posición de los dedos) como la superficial (táctil, térmica y dolorosa) y por tanto, la capacidad del sujeto de sentir una agresión en el pie (zapatos muy ajustados, cuerpo extraño dentro del zapato, caminar sobre superficie con demasiada temperatura, sobrecarga de presión, microtraumatismos). De esta manera,

el paciente no podrá advertir la lesión ni poner en marcha mecanismos de defensa para evitarla [59].

Macroangiopatía

La afectación arteriosclerótica de los vasos de mediano y gran calibre, tiene en el paciente con diabetes predilección por las arterias geniculares de la pierna, y es bilateral y segmentaria, en varones con diabetes es cuatro veces más frecuente, mientras que es ocho veces más frecuente en mujeres con respecto a la población general. La disminución del oxígeno y nutrientes conduce a la necrosis cutánea, dando lugar a la úlcera neuroisquémica. De igual forma, se dificulta la cicatrización de heridas y el tratamiento de la infección [59].

Factores secundarios

Artropatía

La causa más frecuente de artropatía neuropática es la diabetes. La denervación osteoarticular origina una desestabilización articular dando lugar a un mal reparto de las cargas y traumatismos repetidos, lo que desencadena fragmentación, degeneración por sobrecarga del cartílago e incluso erosión del hueso.

Independientemente de la neuropatía, cualquier deformidad articular en el pie, facilitará en un paciente con riesgo, la aparición de lesiones.

Nivel socioeconómico

La situación social, familiar y el nivel cultural del paciente deficiente se han relacionado con un mayor riesgo en la formación de úlceras y de amputaciones. Malos hábitos de higiene, la no aceptación de la enfermedad, el escaso interés por la información, la demora en la consulta por la aparición de lesiones iniciales y el deficiente respaldo familiar implican, no solo una mayor incidencia de las lesiones y complicaciones, sino también una peor evolución de las mismas.

Factores precipitantes o desencadenantes de lesión en el pie del paciente con diabetes

En el pie diabético los “*factores clave*” en el proceso de la ulceración o lesión, son: el nivel de respuesta sensitiva (grado de neuropatía), la capacidad de los tejidos para resistir la alteración neuropática (por la macro y microangiopatía), y el tipo, magnitud y duración del estrés o presión aplicada [59].

Factores extrínsecos

- *Traumatismo mecánico*: a) impacto intenso, localizado, que lesiona la piel, por ejemplo el pisar un clavo; b) presión ligera y sostenida que provoca una necrosis isquémica. Suele corresponder a zapatos mal ajustados (es el factor más frecuente en el pie neuroisquémico).

- *Traumatismo térmico*: por descansar cerca de una fuente de calor, utilizar bolsas de agua caliente, andar descalzo por arena caliente o no proteger el pie de temperaturas muy bajas.

- *Traumatismo químico*: producido por agentes queratolíticos.

Factores intrínsecos

Cualquier deformidad en el pie o limitación de la movilidad articular condiciona un aumento de la presión dando lugar a hiperqueratosis (callosidades), que son lesiones pre-ulcerosas.

Factores agravantes de lesión

El factor más importante en el mantenimiento de la úlcera es la infección. Ésta se beneficia de la ausencia de dolor (por la neuropatía), lo que favorece el desarrollo insidioso de una celulitis extensa o de un absceso; de la hiperglucemia, que altera los mecanismos inmunitarios, sobre todo la inmunidad celular; y de la isquemia, que compromete el aporte de oxígeno y de nutrientes, así como la llegada de los antibióticos.

Neuropatía diabética

El paciente con problemas de sensibilidad en el pie, deberá recibir una educación podológica específica para suplir el déficit sensorial con la observación y cuidado diario de sus pies. También, en caso de hiperqueratosis (zonas de hiperpresión), se pueden

beneficiar de la medición de presiones plantares y confección de plantillas de descarga para prevenir la aparición y desarrollo del mal perforante plantar [59].

Macroangiopatía diabética

Para detectar la vasculopatía periférica podemos utilizar el índice tobillo brazo. Se establece el diagnóstico de vasculopatía periférica cuando este índice es menor de 0,9 o si el paciente refiere clínica de claudicación intermitente. En casos de índices menores de 0,6 será necesaria una valoración hemodinámica completa con arteriografía y/o medición transcutáneo de oxígeno. Si el índice es superior a 1,2 deberemos pensar en calcificaciones arteriales, careciendo de valor la prueba [59].

El estricto control de los factores de riesgo cardiovascular: hiperglucemia, dislipemia e hipertensión arterial en el paciente diabético, consigue reducir los episodios cardiovasculares y mejorar la mortalidad global.

Movilidad articular disminuida

En los pacientes con diabetes y movilidad articular disminuida, será necesaria una educación específica para evitar el desarrollo de lesiones. En algunos casos, la cirugía ortopédica puede mejorar esta movilidad y disminuir el riesgo de lesión. Por otro lado, un calzado adecuado o diferentes ortésis según las necesidades del paciente por su grado de disminución articular y deformidad pueden disminuir el riesgo [59].

Pie seco e hiperqueratosis

Es aconsejable una buena hidratación mediante cremas hidratantes para reducir la sequedad y aparición de fisuras y las hiperqueratosis (callosidades) deberán ser tratadas por el podólogo y nunca por el paciente [59].

Obesidad

La dieta y el ejercicio físico ayudarán a disminuir el peso y con ello la resistencia a la insulina, mejorando el control de la hiperglucemia, dislipemia e hipertensión arterial. Además, la disminución de peso evitará sobrecargar zonas de hiperpresión y ayudará a mejorar la arquitectura del pie [59].

Disminución de la visión

Deberá ser suplida por la exploración diaria del pie, por un familiar o un cuidador entrenado y sensibilizado hacia las lesiones del pie [59].

Mal control metabólico

Se deben utilizar todas las herramientas terapéuticas disponibles para mejorar el control metabólico de nuestros pacientes con diabetes. Con ello se reduce el riesgo de neuropatía, macroangiopatía e infección de las lesiones [59].

Calzado no adecuado

Se deberá educar al paciente sobre el calzado indicado para evitar la aparición de las lesiones.

Higiene deficiente de pies

Se instruirá al paciente y familiares en la importancia de una buena higiene del pie, utilizando jabones con pH ácido o neutro, bajos en detergentes y un secado adecuado de la zona interdigital [59].

Nivel socioeconómico bajo, alcoholismo, aislamiento social

En este grupo de pacientes será necesario articular medidas para que sean informados de la importancia de la exploración, cuidado e higiene diaria del pie. Todo paciente con diabetes y el personal sanitario que lo atiende, deben conocer la importancia de la observación, exploración y cuidado diario de los pies.

Además, deben ser informados de los factores de riesgo para poder prevenir la aparición de las lesiones. Dado que la prevalencia de la diabetes es elevada y no todos los diabéticos desarrollan problemas podológicos deberemos estratificar el riesgo. Para ello, podemos utilizar los parámetros indicados en la Tabla 10.

Con estos parámetros podremos de una forma sencilla clasificar a nuestros pacientes y elaborar un programa de seguimiento y educación específica para evitar la aparición de lesiones [59].

Riesgo	Sensibilidad alterada	Deformidad/callos	Úlcera/amputación previa	Revisión
0	no	no	no	anual
1	si	no	no	semestral
2	si	si	no	trimestral
3	si	si	si	mensual

Tabla 10. Grado de riesgo y frecuencia de revisiones del pie en el paciente con diabetes. Tomada de Real, JT. [59]

2.3 HERIDAS COMPLEJAS

Conceptualmente, la herida es una pérdida de la solución de continuidad de la piel o mucosa por un traumatismo abierto originado por agentes mecánicos, físicos o químicos. Habitualmente producen dolor, hemorragia y separación de los bordes que tras su tratamiento incluyendo la sutura cicatrizan mediante un proceso de proliferación celular y molecular que acontece en una serie de fases (fase inflamatoria, proliferativa y de remodelación). Las heridas son complejas cuando este proceso se detiene en cualquiera de las fases de la cicatrización. Son múltiples las causas que detienen este proceso biológico entre ellas: la edad, isquemia, la infección o la inmunodepresión, por lo tanto la herida del pie diabético puede catalogarse dentro del concepto de herida compleja.

2.4 PROCESO DE CICATRIZACIÓN EN EL PACIENTE DIABÉTICO

En pacientes con síndrome del Pie Diabético, todas las etapas de la cicatrización se ven alteradas. Esto conduce a una imagen específica de la herida diabética, que es un sello distintivo de la patología. Se ha demostrado que un gran número de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas, se encuentran en diferentes niveles en el suero en los pacientes diabéticos.

Estos factores son responsables de iniciar el proceso de reparación de la herida y su mantenimiento, dando lugar a una disminución gradual de la respuesta inflamatoria

[60]. Las heridas diabéticas se caracterizan por un nivel reducido de los siguientes factores de crecimiento y receptores: KGF (factor de crecimiento de queratinocitos), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante beta), NGF (factor de crecimiento nervioso), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), IL-8 (interleucina-8), IL-10 (interleucina-10), IL-15 (interleucina-15), la neurotrofina-3 (NT-3), la sustancia P, CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) [61]. La disminución de los niveles de estos importantes factores de crecimiento podría contribuir a una mala regeneración tisular y a una alteración de la cicatrización de heridas.

2.5 LA MEMBRANA AMNIOTICA: CARACTERÍSTICAS Y POTENCIAL TERAPEÚTICO

2.5.1 Origen y características

La membrana amniótica (MA) es la capa más interna de la placenta, que se encuentra en contacto con el feto. Es una estructura de origen materno-fetal con forma de disco que mide alrededor de 15 a 20 cm de diámetro. Está formada por:

La placa coriónica constituida por el amnios y el corion (Figuras 8 y 9), que representa el compartimento fetal y se enfrenta a la cavidad amniótica, y la llamada placa basal, que es de origen materno y está formada por las deciduas (basal y parietal) [62].

En el disco placentario las vellosidades coriónicas mantienen las dos placas juntas. Las membranas fetales (amnios y corion) cubren la cavidad amniótica donde se encuentra

el feto, protegiéndolo durante su desarrollo y ofreciéndole un entorno seguro, donde puede crecer sin ser distorsionado por la presión de estructuras vecinas [63].

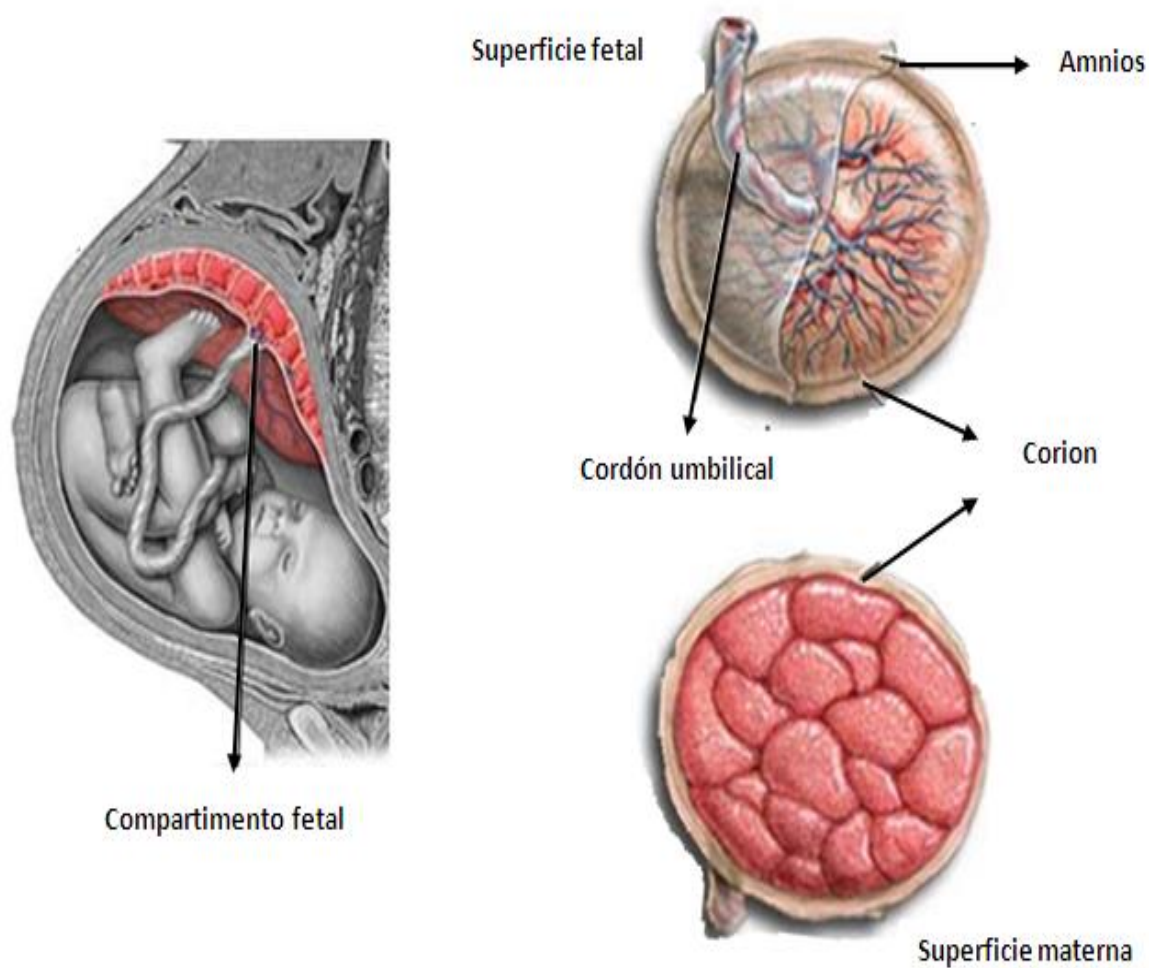


Figura 8. Anatomía normal de la placenta. Modificada de Carpenter et al. [64]

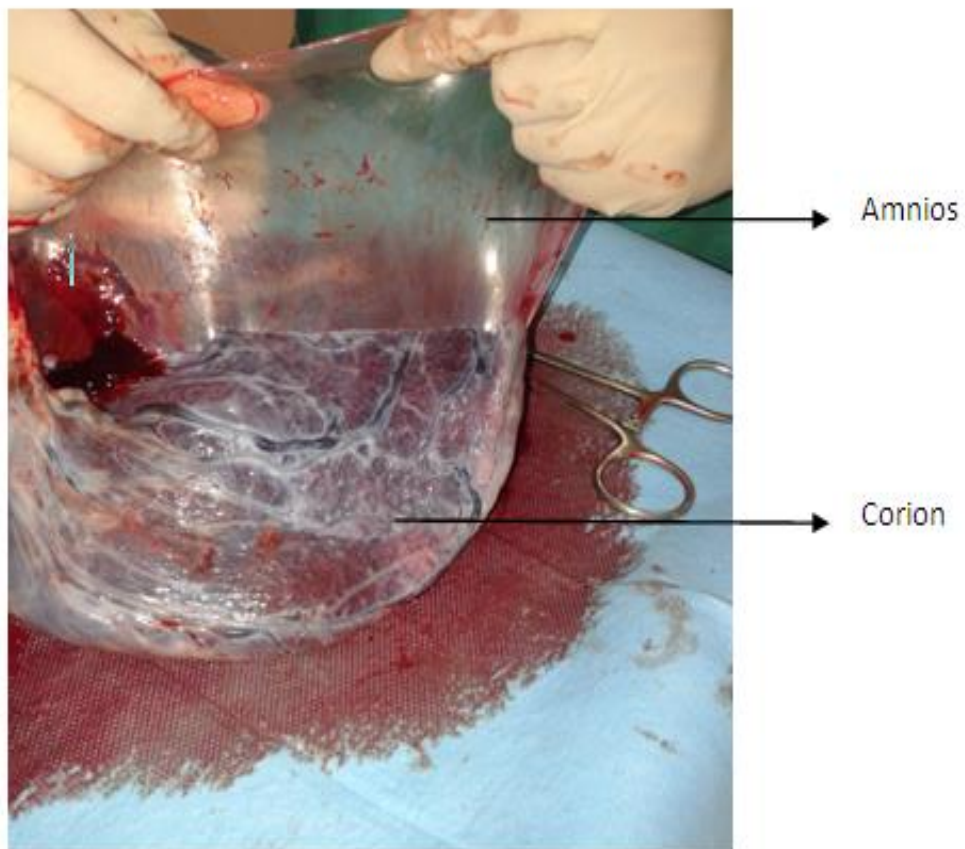


Figura 9. Aspecto de la MA durante su obtención, separándola del corion mediante disección roma. Imagen tomada en el quirófano maternal del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).

La estructura de la MA tiene tres partes: una monocapa epitelial, una membrana basal, y un estroma avascular.

La monocapa epitelial consiste en una sola capa de células que están dispuestos de manera uniforme sobre la membrana basal. Es la capa más interna, se encuentra más

cercana al feto, y es también llamada epitelio amniótico. Las células epiteliales amnióticas tienen funciones de secreción y de transporte [65]. Este epitelio está firmemente fijado a una membrana basal, que a su vez está conectado a una capa acelular. Esta capa se compone de colágeno de los tipos I, II, y V [65]. Los vasos sanguíneos o los nervios están ausentes en la membrana amniótica. Su nutrición deriva directamente de la difusión de líquido amniótico.

La membrana basal es bastante notable, ya que es una de las membranas más gruesas, y proporciona apoyo para el feto durante la gestación [66]. Es similar a la de la conjuntiva en su distribución de colágeno de tipo IV.

El principal esqueleto fibroso de la membrana amniótica está formado por la capa compacta de estroma. La siguiente capa es una capa fibroblástica formada por células mesenquimales responsable de la secreción de diferentes tipos de colágeno. Los tipos predominantes son los colágenos intersticiales (Tipo I y III) que forman haces paralelos para mantener la integridad mecánica de la membrana. Las conexiones entre los colágenos intersticiales y epiteliales de la membrana basal la proporcionan los colágenos tipos V y VI. La última capa que se conoce como capa intermedia o capa esponjosa, se encuentra adyacente a la membrana coriónica y contiene una malla de colágeno en su mayoría de tipo III (Figura 10). Su aspecto esponjoso es el resultado de la presencia de abundante contenido de proteoglicanos y glicoproteínas [65].

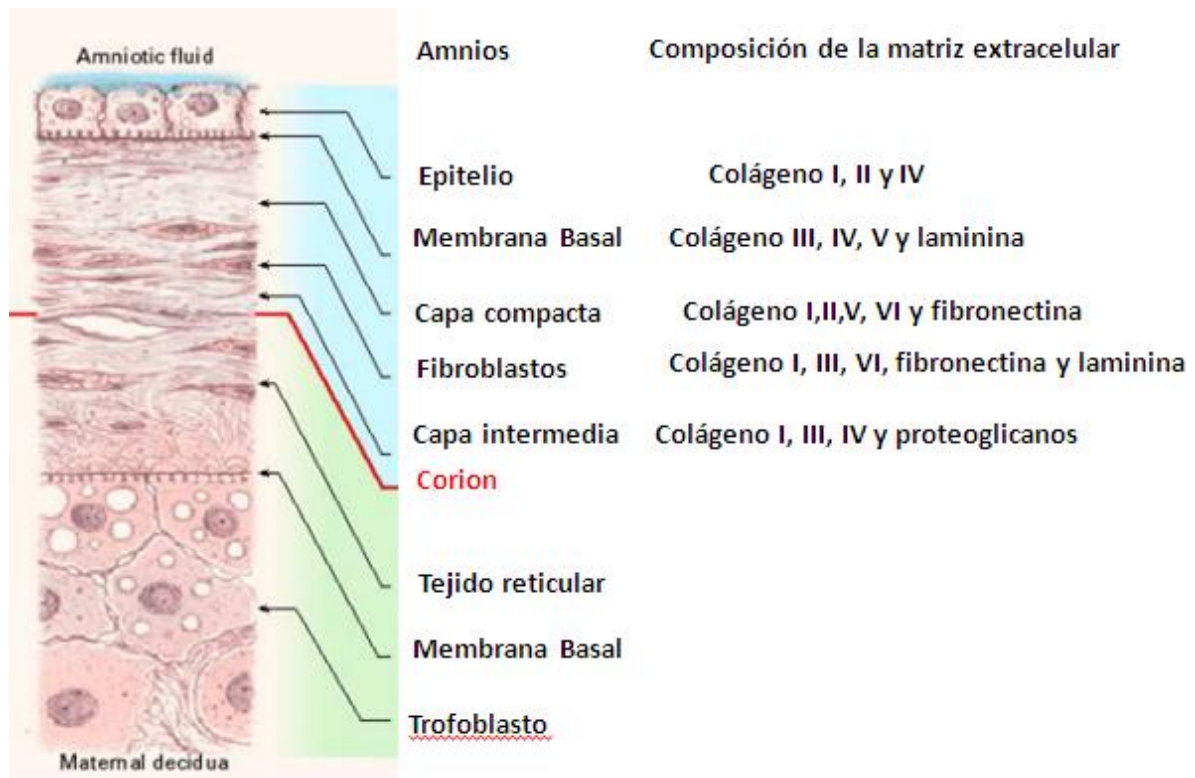


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de la membrana fetal a término. Modificada de Niknejad, H. 2008 [66].

2.5.2 Propiedades de la MA como tejido completo

La MA se ha convertido en un tejido muy atractivo para terapia, ya utilizado desde hace años en la práctica clínica como apósito biológico por sus propiedades y sus pocas connotaciones éticas, al tratarse de un tejido desechado tras el alumbramiento. En los últimos tiempos, ha aumentado el conocimiento sobre la MA y se han aislado a partir de

este tejido humano Células Epiteliales Amnióticas (human Amniotic Epitelial Cells-hAEC) y Células Mesenquimales Estromales Amnióticas (hAMSC).

Propiedades biomecánicas

Una importante característica de la MA es su resistencia a diversos factores proteolíticos debido a la presencia de colágeno intersticial [65]. La elastina presente en el amnios es responsable de proporcionarle elasticidad. El espesor del tejido amniótico de la membrana se encuentra entre 0,02 y 0,5 milímetros e incluye alrededor de 6-8 capas de células. La superficie media de esta membrana es de aproximadamente 1.600 centímetros cuadrados [65]. La membrana amniótica tiene múltiples funciones metabólicas tales como su papel en el transporte de agua y material soluble y la producción de péptidos bioactivos, factores de crecimiento, y citoquinas [67].

Efecto analgésico y de barrera

La aplicación de amnios a un lecho de la herida impide la desecación y la pérdida excesiva de líquidos, y proporciona un efecto analgésico mediante la protección de terminaciones nerviosas expuestas al ambiente por presentar mejor adherencia y adaptación a la superficie de la herida que otras membranas sintéticas [68].

Promoción de la epitelización

Facilita la migración de las células epiteliales [69], refuerza la adhesión celular [70], promueve la diferenciación epitelial [71], previene la apoptosis epitelial [72] y por todo ello, promueve la epitelización de heridas [73,74]. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor, EGF*), el factor de crecimiento transformante (*Transforming growth factor, TGF*) , el factor de crecimiento de queratinocitos (*Keratinocyte growth factor, KGF*), el receptor del *KGF* (*Keratinocyte growth factor receptor, KGFR*), el factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte growth factor, HGF*), el receptor del *HGF* (*Hepatocyte growth factor receptor, HGFR*), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), y los *TGF- α 1*, *- α 2* y *- α 3* producidos por MA pueden estimular la epitelización [75]. También puede promover la expansión y el mantenimiento de las células progenitoras epiteliales in vivo [76] y puede producir endotelina-1 y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea.

Koizumi et al. en 2002 [75] demostró la expresión de ARNm en la M.A. criopreservada para el factor de crecimiento epidérmico, y el receptor del factor de crecimiento de queratinocitos. Su lámina basal sirve como base para el crecimiento de células epiteliales, proporcionando oxigenación suficiente para la permeabilidad de las células epiteliales en comparación con otros materiales sintéticos. Por lo tanto, la MA es un tejido ideal que facilita el crecimiento de las células epiteliales, ayudando en su migración y diferenciación [77]. Recientemente nuestro grupo, ha demostrado el efecto

de la MA sobre la respuesta de TGF β sobre los queratinocitos, permitiendo que estos progresen hacia la epitelización en heridas crónicas [78].

Inhibición de la fibrosis

La MA posee propiedades antifibróticas (tabla 11). Los fibroblastos son responsables de la formación de cicatrices durante la cicatrización de las heridas, activados por el factor de crecimiento transformante β .

La MA reduce el riesgo de fibrosis por regulación a la baja del factor de crecimiento transformante β y su receptor expresión por los fibroblastos. Por lo tanto, la membrana amniótica modula la curación de heridas promoviendo la reconstrucción de los tejidos en lugar de promover la formación de la cicatriz tejidos [79].

Inhibición de la inflamación

El mecanismo exacto por el que la MA posee propiedades anti-inflamatorias no está claro. Se plantea la hipótesis de que disminuye la afluencia de células inflamatorias a la zona de la herida y por consiguiente reduce mediadores de la inflamación, sirviendo como barrera. Tanto las hAEC como las hAMSC sintetizan inhibidores tisulares de las metaloproteasas secretadas por neutrófilos y macrófagos. En la MA se ha observado la producción de inhibidores tisulares de las metaloproteasas 1, 2, 3, y 4, de la interleucina-10 y la interleucina-1 (antagonista del receptor de endostatina) que inhiben el crecimiento tumoral [80, 81].

La trombospondina-1, proteína secretada por el epitelio amniótico, actúa como un factor antiangiogénico. Dos mediadores proinflamatorios muy potentes, como son la interleuquina-1 α y la interleucina-1 β , se suprimen por el estroma de la matriz de la membrana amniótica [82]. Shimmura et Alabama. en 2001 informaron que la MA reduce la inflamación a través del atrapamiento de células inflamatorias [83].

Los glicosaminoglicanos y el ácido hialurónico, presente en grandes cantidades en la MA, actúa como un ligando para CD44 que se expresa en las células inflamatorias. Eso desempeña un papel importante en la adhesión de células inflamatorias incluyendo linfocitos, en el estroma de la MA [84].

Otras sustancias expresadas en la MA son proteinasas y elafin (inhibidores de la proteasas) [85,86] tienen acciones antimicrobianas además de sus propiedades anti-inflamatorias [87] ya que protegen la superficie de infecciones, actuando de este modo como componentes del sistema inmune innato [87]. Las propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias también pueden ser inducidas por la secreción de la lactoferrina [88] que es una proteína globular multifuncional, con propiedades tanto antimicrobianas como anti-inflamatorias. Sirve como un antioxidante y agente quelante del hierro en los tejidos [89] y suprime la producción de interleucina-6 en el líquido amniótico durante la infección.

Inmunogenicidad de la MA

Las hAMSC y las hAEC aisladas de la membrana amniótica no expresan antígenos leucocitarios humanos (Human leukocyte antigen, HLA) HLA-A, HLA-B, HLA-C, y HLA-DR ni HLA-DQ. [90]. No obstante, las hAEC sintetizan elevadas cantidades de *HLA-G*, [91] implicado en la tolerancia inmune. La función immunotolerante parece realizarla mediante 4 funciones inhibitorias: 1) se une al receptor inhibitorio de las células *natural killer* (*Nk*), así como a otros leucocitos; 2) posee un péptido líder para unirse al *HLA-E*, que produce un efecto inhibitorio de la actividad citotóxica de las células *Nk*; 3) induce la apoptosis de las células T CD8+; y 4) inhibe la proliferación de las células T CD4+ [92]. Por otro lado, las hAEC expresan Fas ligando. Se trata de una proteína de membrana de tipo II, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (*TNF*). Tiene como función activar la vía de la apoptosis mediada por receptores de los linfocitos T citotóxicos CD8+.

Por todo ello, la MA no induciría respuestas inmunológicas significativas en el lugar del implante, haciendo innecesaria la terapia de supresión inmune (tabla 11).

Además, se ha sugerido que la MA criopreservada tiene menor inmunogenicidad que la MA en fresco [93]. Sin embargo, la supervivencia del implante *in vivo* de tejido o células procedentes de la MA era inferior en los receptores que recibían implantes repetidos que en aquellos que lo recibían por vez primera. También sucedía en

determinadas zonas en las que se realizaba el implante [94]. Así, en aplicaciones clínicas, habría que tener en cuenta este riesgo inmunogénico dependiente del lugar y de la repetición de trasplante.

Propiedades antimicrobianas y antivirales

La aplicación de MA sobre el lecho de heridas puede tener un efecto barrera similar al papel que juegan las mucosas como parte del sistema inmune innato. Varios autores han demostrado la capacidad de la MA para producir β - defensinas, siendo la β 3- defensina el subtipo predominante en el epitelio amniótico [86, 95, 96].

Las defensinas son proteínas de bajo peso molecular que forman parte de la respuesta inmune innata (primera barrera que nos defiende contra las infecciones por microorganismos) sintetizadas en la superficie de mucosas por las células epiteliales y los leucocitos. Son péptidos altamente básicos, ricos en cisteína, que poseen actividad antimicrobiana directa de amplio espectro que abarca bacterias, hongos, virus y además poseen capacidad para neutralizar toxinas (tabla 11) [95].

Además de la producción de péptidos antimicrobianos, la aplicación de MA favorece unas condiciones en la herida que disminuyen el riesgo de infección. Las propiedades hemostáticas de las fibras de colágeno de la lámina basal de la MA evitan la formación de hematomas en la herida, lo que reduce el riesgo de infección mediante la

prevención del acúmulo de microbios. Por otra parte, la adhesión de la MA al lecho de la herida previene la formación de espacios muertos y acumulación serosa. Así mismo, los filamentos de fibrina que se forman durante la cicatrización, se adhieren al colágeno de la MA y atrapan bacterias, a la vez que favorecen la migración de fagocitos al lecho de la herida para su destrucción.

Estos efectos se traducen en la reducción y/o control de la carga bacteriana en las heridas tras la aplicación de MA en heridas previamente contaminadas [97].

Sistema Inmune	Tejido Epitelial	Tejido Mesenquimal	Propiedades biomecánicas
Supresión de la inflamación	Estimulación de factor de crecimiento epitelial	TGF- β supresión de la diferenciación miofibroblástica	Avascular, carente de células, no respuesta inmune
Factores antibacterianos y antivirales	Factor de crecimiento epidérmico y de queratinocitos	Reducción de cicatrices	Tejido resistente y duro
Induce la apoptosis de células inflamatorias		Regeneración axonal	Elástico y transparente
		Factor de crecimiento neuronal	Actúa como barrera física y analgésico

Tabla 11. Propiedades y mecanismos de acción de la MA. Modificada de Gupta, A. 2015 [65]

2.5.3 Propiedades de los tipos celulares aislados en la MA

La placenta humana, además de jugar un papel fundamental y esencial en el desarrollo del feto, la nutrición y la tolerancia, también puede representar una reserva de células madre progenitoras.

Usando diversos protocolos [98-101] se han identificado células epiteliales amnióticas (hAEC) con características de células pluripotenciales con potencial de diferenciación hacia linajes de diferentes capas germinales, [102] y propiedades inmunomoduladoras [103-106] y Células Mesenquimales Estromales de la MA (hAMSC) que son células multipotenciales, aunque algunos investigadores han demostrado una capacidad de diferenciación mas allá de la línea mesodérmica [103,107].

Las células obtenidas del epitelio amniótico recién aisladas expresan los marcadores de superficie asociados con células madre embrionarias SSEA-3, SSEA-4 (del inglés Stage Specific Embryonic Antigen), TRA 1-60 y TRA 1-81 (del inglés Tumor Rejection Antigen). Además, expresan moléculas como E-caderina, CD9, CD29, CD104, CD49e, CD49f, CD49d y CD44 que, junto con otras moléculas, participan en los procesos de interacción y adhesión celular. Igualmente, las células obtenidas del epitelio amniótico expresan factores de transcripción específicos de células madre pluripotenciales: Oct-4, Sox-2, Nanog y Rex-1 [91, 108,105].

En cultivos primarios estas células proliferan y forman una capa de células confluentes con la típica apariencia de células epiteliales [91,109]. En subcultivos experimentan la transición epitelio-mesénquima mediada por la producción autocrina del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Los diferentes marcadores de superficie de las células epiteliales les sugieren cierta heterogeneidad de fenotipo. Inmediatamente después del aislamiento, las células hAECs parecen expresar niveles muy bajos de antígeno leucocitario humano (HLA) A, B, C [110].

Los marcadores de superficie que están ausentes en las hAECs incluyen SSEA-1, CD34, y CD133, mientras que otros marcadores, tales como CD117 (c-kit) y CCR4 (receptor de quimioquinas CC), son ya negativos o puede ser expresados en algunas células a niveles muy bajos. Aunque las células iniciales aisladas expresan niveles muy bajos de CD90 (Thy-1), la expresión de este antígeno aumenta rápidamente en cultivo [91, 105,108].

Las células obtenidas del estroma amniótico se definen por su capacidad de proliferar adheridas al plástico, con apariencia fusiforme, de producir unidades formadoras de colonias fibroblásticas y de expresar un patrón de antígenos en la superficie celular, similar al de las células mesenquimales de la médula ósea y de otras fuentes. Expresan concentraciones variables de CD90, CD73, CD105, CD29, CD44, CD49d,

CD49e, CD56 y CD166, no expresan los marcadores de células hematopoyéticas: CD45, CD34, CD14 y son reconocidas por el anticuerpo monoclonal STRO-1.5 [109].

Además de estos marcadores, las células aisladas del epitelio amniótico y las obtenidas del estroma amniótico (tabla 12) no expresan el receptor de muerte celular programada (PD-1: programmed cell death receptor), un receptor inhibitorio normalmente expresado en las células T y B activadas; tampoco sus dos ligandos: PD-L1 y PD-L2 (programmed death ligands 1 and 2), que sí se expresan en presencia de IFN- γ . [111]. Estas células tampoco expresan los receptores ILTR-2, ILTR-3 e ILTR- 4 (del inglés immunoglobulin like transcript receptors), expresados en los linfocitos T y B, en las células NK (del inglés natural killer) y en las células dendríticas [111]. Hay controversias acerca de la expresión de TRAIL, TNF- α y el ligando de FAS (Fas-L), todos ellos miembros de la familia TNF involucrada en la inducción de apoptosis [111].

Las características señaladas sugieren que estas células son hipoinmunogénicas y que juegan un papel importante en la inmunorregulación.

Positivo (>95%)	Negativo (<2%)
CD90 CD73 CD105	CD45 CD34 CD14 HLA-DR

Tabla 12. Expresión de antígenos de superficie específica en pases 2- 4 para células mesenquimales del estroma amniótico. Tomada de O. Parolini, 2008 [91]

Mientras que el potencial de expansión y diferenciación de las células derivadas de MA ha sido bien estudiado y caracterizado por diferentes grupos, [91, 102, 105,112] el conocimiento disponible acerca de su potencial inmunomodulador es relativamente escaso y disperso. Sin embargo, en los últimos años, se han demostrado propiedades inmunomoduladoras de células presentes en la MA, capaces de producir un efecto regulador en enfermedades inflamatorias, estimulando células T reguladoras para controlar el efecto inflamatorio en la artritis reumatoide [113].

El aumento de los resultados experimentales ha apuntado hacia las propiedades inmunomoduladoras de estas células, y se espera que se pudiera expandir su potencial terapéutico para aplicaciones clínicas.

2.5.4 Aplicaciones clínicas de la MA

En 1910, Davis fue el primero en reportar el uso de membranas fetales como material quirúrgico en la piel [114]. A continuación, el uso de la MA se fue expandiendo, utilizándose como un apósito biológico para la piel quemada, en la epidermólisis bullosa [115] en heridas y en úlceras venosas, [116,117]. También se empleó como un adyuvante de la reconstrucción quirúrgica de la vagina artificial [118], y para evitar la adhesión de tejidos en cirugía del abdomen, cabeza y pelvis [119,120]. En 1940 varios autores informaron del papel beneficioso de la MA en el tratamiento de una variedad de afecciones de la superficie ocular. [121, 122]. Sin embargo, su uso fue abandonado durante décadas [123] desapareciendo de la literatura oftálmica documentada, hasta que a principios de la década de los noventa, Batlle et al. la utilizó para reparar defectos de la conjuntiva [124].

Cuando la cicatrización de las heridas con apósitos o autoinjertos no es eficaz, la MA constituye una de las alternativas para el tratamiento en úlceras recalcitrantes de las piernas. [125]. Además, es menos costoso en comparación con láminas epidérmicas o sustitutos de la piel [126].

La MA ha sido utilizada; (Tabla 13) desnuda, irradiada, liofilizada, líquida, micronizada, criopreservada, deshidratada y esterilizada [127, 128, 129,130].

NOMBRE COMERCIAL	FORMA FARMACÉUTICA
Epifix®	Deshidratado
Purión®	Deshidratado e irradiado, liofilizada
AmnioShield®	Deshidratada y esterilizada
BioXclude™	Deshidratada y esterilizada
AmnioFix®	Inyectable (micronizado)
CLARIX®FLO	Criopreservado
NEOX®FLO	Criopreservado
AMNIOEXCEL®	Deshidratada
PalinGen Flow®	Fluido

Tabla 13. Productos comercializados con MA. Elaboración propia.

3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La MA ha sido ampliamente utilizada en el ejercicio médico para el tratamiento de quemaduras cutáneas, en úlceras, en epidermólisis bullosa y en diversas patologías oftalmológicas [77,131-133]. La MA es un tejido de especial importancia como apósito biológico, con numerosas ventajas sobre otros apósitos biológicos y sintéticos debido a su estructura particular parecida a la piel, a sus propiedades biológicas y a sus características inmunológicas.

La MA actúa como una barrera específica, reduce la pérdida de calor, líquidos y proteínas, tiene buena adherencia a la herida, es bacteriostática y reduce la incidencia de infección, tiene efecto analgésico, no produce reacciones inmunológicas, se adapta bien a las heridas y permite una movilización temprana del paciente.

Resulta un tejido de bajo costo, de fácil obtención y con pocas connotaciones éticas, pues constituye un producto de desecho tras el alumbramiento.

A partir de la observación clínica de pacientes con úlceras complejas de pie diabético, patologías subyacentes y multitud de variables que dificultan la favorable resolución de estas heridas, y ante el fracaso de diferentes tratamientos (apósitos antimicrobianos, espumas hidrocoloides, descargas ortoprotésicas), que no consiguen

evitar ingresos hospitalarios y amputaciones menores y mayores, se hace necesaria la utilización de terapias avanzadas y en este caso la utilización de nuevas estrategias terapéuticas.

Existe por tanto la necesidad de proporcionar a estos pacientes una alternativa que les mejore la calidad de vida, con una disminución de las curas, proporcionándoles una asistencia ambulatoria. Nuestro grupo de trabajo multidisciplinario está compuesto por un Servicio de Ginecología y Obstetricia donde de forma diaria se realizan cesáreas programadas, una Sala Blanca ubicada en el Servicio de Hematología donde se procesa y almacena este tejido, una consulta de Cirugía General con Unidad de Heridas y Pie Diabético, y un laboratorio de Oncología molecular y TGF β donde se estudian las vías moleculares activadas en el binomio MA y TGF β , lo que nos permitió estar en óptimas condiciones para establecer una línea de tratamiento integral de estos pacientes con MA.

En este trabajo de investigación clínica, se analiza de forma retrospectiva la experiencia adquirida en la aplicación de MA criopreservada en pacientes tratados en la Unidad de Heridas y Pie Diabético de nuestro hospital, reportando las características y evolución de las úlceras en los pacientes con pie diabético, incluidos en un programa de uso compasivo autorizado de forma individual para cada paciente por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

4 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis conceptual

La MA es una herramienta clínica útil en las úlceras complejas de pie diabético.

Hipótesis operativa

La evolución favorable de las úlceras complejas de Pie Diabético tratadas con MA, favorecerá la implantación de este tratamiento en estudios posteriores, y permitirá determinar parámetros moleculares de interés en la inflamación crónica y en las heridas complejas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la aplicación de la MA en úlceras complejas en Pie Diabético mediante un programa de uso compasivo.

Objetivos específicos:

- a) Describir las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con úlceras de Pie Diabético, incluidos en esta serie.
- b) Reportar la contaminación bacteriana presente en dichas úlceras durante el tratamiento con MA.
- c) Evaluar la seguridad de la aplicación de MA en estas úlceras.
- d) Evaluar la eficacia de este tratamiento.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Obtención de la MA

La MA se obtuvo de mujeres gestantes a término que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- Donantes sanas con embarazo controlado tras una cesárea electiva por motivos obstétricos.
- Analítica seronegativa por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para todas las infecciones transmisibles como son: el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV 1 y 2), Virus de la Hepatitis B (HBV), Virus de la Hepatitis C (HCV), Virus Linfotrófico de Células T Humanas (HTLV), Citomegalovirus (CMV), Virus Epstein Barr (EBV), toxoplasma y sífilis en el momento de la extracción del tejido.
- Previa a la extracción de la MA, todas las donantes firmaron un consentimiento informado específico para la donación de tejidos una vez que fueron informadas del procedimiento (Anexo I).

Tras el protocolo establecido en la Unidad de Ginecología y Obstetricia, la donante se traslada al quirófano para la intervención, y en condiciones estériles, una vez que tuvo lugar el alumbramiento, se extrajo la placenta que se depositó en una mesa

auxiliar (figura 11) sobre un paño estéril. La MA fue diseccionada con pinzas quirúrgicas y un bisturí, separándola mecánicamente de la membrana coriónica.

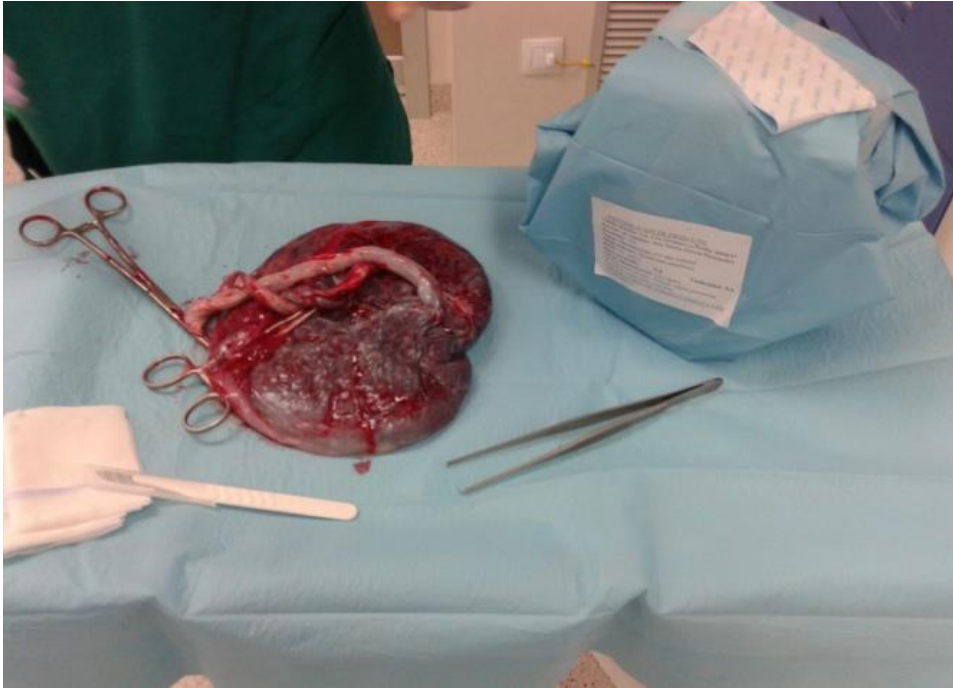


Figura 11. Extracción de MA en el quirófano maternal del HCUVA

Una vez diseccionada la MA se introdujo en un frasco estéril que contenía 1000 ml de solución salina estéril (Grifols, Barcelona, España) con antibióticos [Soltrim® 48mg (Almirall, SA Barcelona, España), Tobramicina® 50mg (Normon, Madrid, España) y Vancomicina® 50mg (Normon, Madrid, España)].

Desde el quirófano, la MA fue transportada de forma inmediata a temperatura ambiente a la Unidad de Producción Celular (UPC) para la fabricación del medicamento en investigación “MA sobre apósito impregnado” (MA-GH; nº de PEI 12-008) que se aplica en el contexto de ensayos clínicos o usos compasivos autorizados por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) siguiendo los requisitos planteados en las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos (NCF/ GMP).

5.2 Procesamiento de la MA

En la UPC, en una cabina de flujo laminar Bio-II-A, la MA fue lavada cuatro veces con solución salina estéril (Grifols, Barcelona, España) para eliminar los restos de sangre y retirar los desechos del corión. La MA se fragmentó en trozos de 8,5 cm x 10 cm y cada fragmento se unió por las cuatro esquinas sobre una apósito de vaselina estéril tulgrasum® (Bama-Geve, S.L.U, Barcelona, España) mediante una sutura de seda trenzada nº 3.0 (Lorca-Marin, Murcia, España).

A continuación, cada fragmento de MA fue introducido en bolsas especiales para ser criopreservado (Macopharma, Francia) añadiendo una solución de congelación a base de albúmina humana al 20% (Grifols, España), Medio TC-199 (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU.) y 9% de dimetilsulfoxido DMSO (Origen, Texas, EE.UU.) (Figura 12).

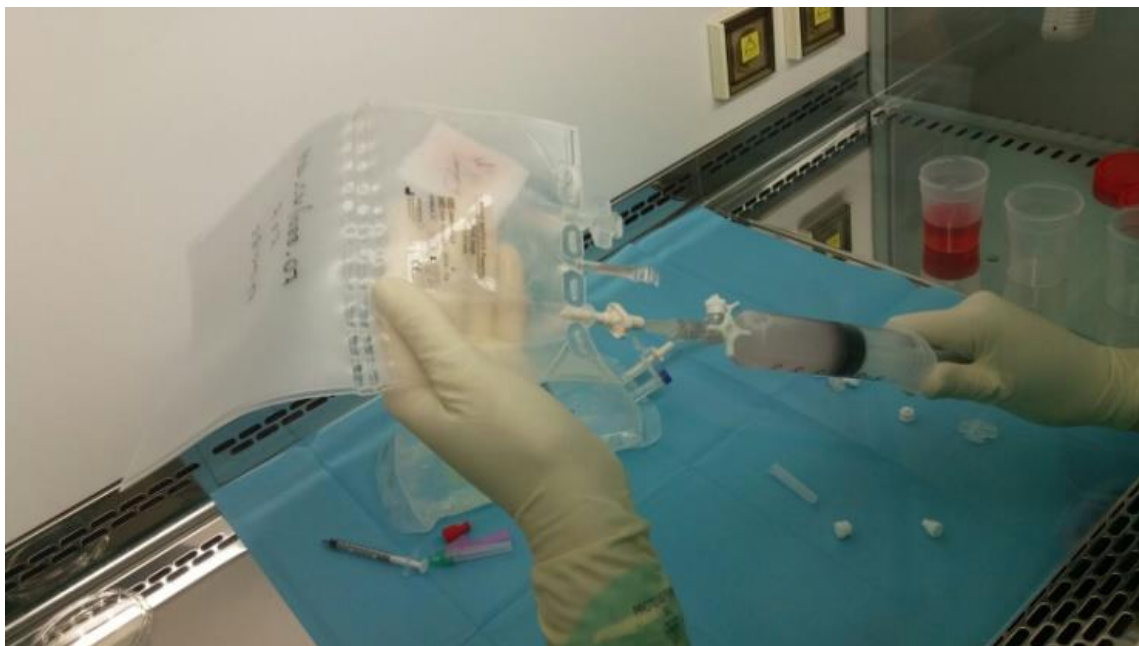


Figura 12. Procesamiento de MA en la Unidad de Terapia Celular del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).

Estos fragmentos fueron criopreservados en un tanque con nitrógeno líquido a -196°C bajo cero, hasta su uso.

Justo antes de su uso, la MA se descongeló a 37°C , en un baño descongelador lavándose tres veces con solución salina estéril, bajo condiciones asépticas antes de ser transportada a la Unidad del hospital en un recipiente con la temperatura controlada entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$.

Para asegurar la esterilidad durante el procesamiento de cada lote de MA criopreservada, se realizó un control de esterilidad basado en Bact-ALERT®3D

(Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francia), al medio que contenía los fragmentos de MA en diferentes etapas del proceso, incluyendo la descongelación y el lavado adicional.

5.3 Viabilidad del producto MA

La estabilidad del medicamento se validó en términos de viabilidad celular. Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó la tinción diferencial con dos colorantes:

- El Azul de toluidina: colorante vital que tiñe estructuras basófilas, tales como la cromatina. Se puede comportar como colorante ortocromático (tiñe de color azul) o metacromático (tiñe de color violeta-rojo), dependiendo del pH y de la naturaleza química de la sustancia teñida.

- El Azul Tripán: colorante diazoico, capaz de penetrar en las células muertas (con daños en membrana) tiñéndolas de azul (tinción de exclusión). Se consideran células viables aquellas que no se tiñen con el colorante.

Las muestras de producto terminado (MA), fueron teñidas con estos dos colorantes en los tiempos establecidos y analizadas inmediatamente.

5.4 Selección de los pacientes

Se trataron pacientes con úlceras crónicas de pie diabético de forma prospectiva bajo un programa de uso compasivo con MA criopreservada en la Unidad de Heridas y

Pie Diabético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca entre mayo de 2014 hasta Noviembre de 2017. Cada tratamiento individual fue previamente autorizado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), por el comité de ética local hospitalario, y se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los pacientes (Anexo II).

Los criterios para la inclusión de los pacientes a este tratamiento fueron:

- Falta de progreso hacia la epitelización de estas úlceras a pesar de los tratamientos estándar aplicados según el protocolo establecido en la Unidad de Heridas.
- Un mínimo de 8 semanas de progreso insatisfactorio se consideró el límite inferior para incluir a los pacientes en el programa de uso compasivo.

Los criterios de exclusión fueron:

- Enfermedad neoplásica activa o infección no controlada.
- No aceptar el tratamiento con MA

5.5 Procedimientos de estudio y tratamiento con MA

Una vez que un paciente fue incluido para el tratamiento con MA, firmó el consentimiento informado y se revisó su historial médico anotando los datos sobre la hemoglobina glicosilada (HbA1c) más reciente, previa al tratamiento con MA.

La HbA1c, fue realizada con cromatografía líquida de alta resolución (HORIBA ABX SA, Madrid, España), en todos los pacientes se hizo una exploración vascular de los miembros inferiores midiendo el índice tobillo brazo (ITB), (Microlife WatchBp home, Lacer, Barcelona, España), una ecografía Doppler para valorar el estado de las arterias, dependiendo de las características de cada paciente, y una radiología simple o una electromiografía (electromiografo digital de tres canales Viking TM Synergy Natus, EUA) para evaluar la morfología y la neuropatía del pie.

Se recogieron las pruebas complementarias que valoraban la vasculopatía así como las diferentes patologías presentes en cada paciente asociadas a la Diabetes Mellitus.

En cada aplicación se tomaron muestras de la herida con un hisopo para el análisis microbiológico en el medio de transporte AMIES VISCOSA (Deltalab SL, Barcelona, España).

La historia clínica incluía la etiología y duración de la herida, las comorbilidades, los dispositivos de descarga ortoprotésica utilizados y el tratamiento previo. Antes y tras cada aplicación de MA todas las heridas se fotografiaron a una distancia de 20 cm.

Las imágenes se midieron mediante el software Image J (Instituto Nacional de Salud Mental, Maryland, EE.UU.). Estas fueron clasificadas usando la escala de Wagner-Meggitt. Esta clasificación establece 6 grados de herida dependiendo de su apariencia: Grado 0 siendo piel intacta, grado 1 úlcera superficial; grado 2 úlcera profunda con exposición de tendones, huesos o articulaciones; grado 3 úlcera profunda con absceso u osteomielitis; grado 4 gangrena del antepie; grado 5 gangrena de pie entero [134].

Una vez que las heridas habían sido clasificadas, se trataron siguiendo el acrónimo T.I.M.E. (Tejido, Inflamación-Infección, control de la humedad y aproximación de los bordes). Según los procedimientos estándar de la Unidad, el 50% de los pacientes recibieron Terapia de Presión Negativa Tópica (TPNT, Renasys® Smith & Nephew, S.A., Barcelona, España).

En caso de sospecha de osteomielitis se realizó una biopsia de partes blandas, que fue transportada en formol al 4% (Histofix ® Panreac Química, Barcelona, España) al laboratorio de Anatomía Patológica.

Para la preparación del lecho de la úlcera se limpió el pie con una esponja jabonosa (Jalsosa SL, Granada, España) y solución salina (Labesfal, Besteiros, Portugal) para eliminar la contaminación de la piel circundante, bacterias y restos de apósitos anteriores.

Cuando la superficie de la herida tenía restos adherentes y tejido necrótico, se retiró mediante un desbridamiento cortante realizado con pinzas quirúrgicas y bisturí. Por último, el lecho de la herida se irrigó con solución salina estéril (Labesfal, Besteiros, Portugal) y se tomó una muestra con un hisopo para el análisis microbiológico.

Una vez que la herida alcanzó una condición óptima, procedimos a la aplicación de MA. En condiciones estériles, se retiró la MA de su envase y los puntos de fijación del apósito impregnado de vaselina. La MA se colocó sobre el lecho de la úlcera cubriendo los bordes y se utilizaron pinzas estériles asegurando su contacto al lecho de la úlcera (figura 13). A continuación, la MA se cubrió con un apósito de vaselina estéril linitul® (Bama-Geve, S.L.U, Barcelona, España).



Figura 13. Aplicación de MA sobre úlcera en Pie Diabético. Consulta de Heridas y Pie Diabético del HCUVA.

Finalmente, se aplicaron gasas estériles y sobre estas un vendaje de crepe. Para evitar la presión externa, los pacientes siguieron usando sus dispositivos ortopédicos de descarga personalizados. Por último, se registraron en la historia clínica de cada paciente todos los datos referentes al procedimiento: lote y número de MA, y aquellas observaciones referentes a las características que presentaban las úlceras.

El número de aplicaciones de MA se basó en la evolución clínica de la úlcera de cada paciente, y el tiempo entre las aplicaciones de MA fue de 7 días. Todo el esquema de tratamiento se realizó de forma ambulatoria.

5.6 Objetivos del estudio. Variables recogidas

Variables principales:

- Acontecimientos adversos tras la aplicación

En cuanto a los acontecimientos adversos se consideraron: la aparición de necrosis del tejido, tejido anómalo, tumoración, signos de infección (calor, dolor, rubor, mal olor, aumento del exudado).

Eficacia:

- Tiempo hasta la epitelización

Se recogió el tiempo en meses previo al tratamiento con MA, y el tiempo de aplicación de MA en semanas hasta la epitelización o retirada del estudio.

Variables secundarias:

- Área de la úlcera
- Número de MA aplicadas
- Aspecto macroscópico y características de las úlceras
- Microorganismos encontrados durante el tratamiento con MA

Se evaluó el área total de la herida en cm², medición previa y posterior a la aplicación de cada MA.

Se recogió el número de MA aplicadas hasta el cierre o la consideración de retirada del tratamiento por falta de eficacia.

El aspecto macroscópico fue observado tras cada cura, reportando el aspecto de las heridas, durante la aplicación de cada MA, y tras la epitelización en las revisiones realizadas.

Se realizó un cultivo microbiológico previo a cada aplicación, para contabilizar los microorganismos presentes en las úlceras.

5.7 Metodología de evaluación del tratamiento. Cronograma

Las visitas de tratamiento-seguimiento se realizaron de forma semanal después de la primera aplicación de MA hasta el cierre de la herida. Las heridas de los pacientes fueron fotografiadas y evaluadas en cada visita.

Se evaluó y documentó, la apariencia de la herida, el aspecto del lecho, el área, el tejido desvitalizado, la presencia y el grado de tejido de granulación, el tipo de exudado y el porcentaje de epitelización en cada visita.

Fueron evaluados los signos de infección (rubor, calor, inflamación y dolor), el aspecto de la piel perilesional y los cambios inflamatorios observados en caso de que apareciesen.

También se registraron los resultados de los cultivos microbianos y los efectos adversos tales como infección, aumento del área de la herida, exéresis óseas, aparición de tumores, signos de rechazo o cicatrización patológica.

De forma semanal se aplicó MA según el procedimiento descrito anteriormente en el apartado (2.6 procedimientos de estudio y tratamiento con MA).

Al tratarse de pacientes con neuropatía sensitiva en mayor o menor grado, no se utilizó ninguna escala para considerar el nivel de dolor, y por lo tanto el dolor no fue valorado.

En todos los casos se realizó un seguimiento de las úlceras epitelizadas para valorar el estado de la piel. Durante la revisión se impartió información para la prevención y el cuidado del pie diabetico, se revisó el calzado de cada paciente y la ortésis en los casos indicados.

Los pacientes con úlceras activas se siguieron realizando las curas, según el protocolo establecido en la Unidad (Anexo III).

Los pacientes dados de alta fueron avisados para un seguimiento al mes y cada 6 meses durante dos años con el propósito de valorar el aspecto de la úlcera epitelizada.

5.8 Metodología estadística

Realizamos un estudio descriptivo en el que las variables numéricas se resumieron como media, desviación típica, mediana, mínima y máxima, y las variables cualitativas con frecuencias y porcentajes.

Para la aplicación del contraste de hipótesis en variables continuas, se valoró inicialmente la normalidad de la muestra mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff, y las condiciones de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. En función de estos resultados, aplicamos la comparación de medias de T-Student para dos factores. Para la comparación de variables cualitativas aplicamos el test de la Chi-Cuadrado, y prueba exacta de Fisher en caso de ser necesario. La magnitud de asociación entre variables cualitativas se realizó mediante los residuos tipificados corregidos.

Todos los resultados se consideraron significativos para un nivel $\alpha < 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo con el programa IBM SPSS Statistics v20 (SPSS Inc., Chicago, IL).

6 RESULTADOS

6.1 Resultados de la viabilidad celular

En las muestras analizadas (inmediatamente tras la extracción de MA, a los 30 minutos y a los 60 minutos) con la tinción de Azul de Toluidina se observa una viabilidad celular del 100% y menos del 10% de células muertas en las tinciones con Azul de Tripán. La viabilidad celular en las muestras de MA a los diferentes tiempos se muestra en la Tabla 14 y Figura 14.

El estudio de la viabilidad se realizó con tres membranas distintas criopreservadas en nitrógeno líquido. Los fragmentos se descongelaron en la UPC según protocolo establecido (PNP-P-033). Una vez obtenido el producto terminado (membrana sobre apósito de tulgrasum descongelada, lavada y envasada), se introdujo en el contenedor de transporte, previamente refrigerado con acumuladores de frío y controlando la temperatura con un Data logger a 20°C.

Cada una de las muestras se mantuvo en estas condiciones en el contenedor de transporte hasta su análisis durante el tiempo establecido en el protocolo de validación (0, 30, y 60 minutos respectivamente) (Tabla 14) obteniendo los siguientes resultados:

LOTE	FRAGMENTO	TIEMPO	% CEL TOLUIDINA +	% CEL TRIPAN+
M1 (M-025)	M1-0	0 minutos	100	≤10
	M1-1	30 minutos	100	≤10
	M1-2	60 minutos	100	≤10
M2 (M-030)	M2-0	0 minutos	100	≤10
	M2-1	30 minutos	100	≤10
	M2-2	60 minutos	100	≤10
M3 (M-031)	M-3-0	0 minutos	100	≤10
	M3-1	30 minutos	100	≤10
	M3-2	60 minutos	100	≤10

Tabla 14. Viabilidad celular en MA. Relación de células vivas por tiempo. Elaboración propia.

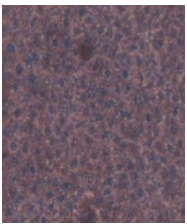
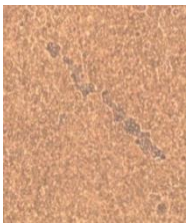
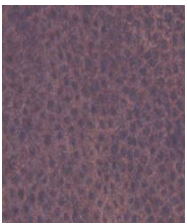
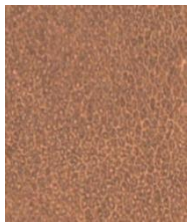
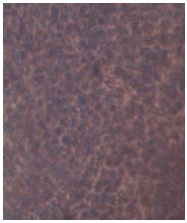
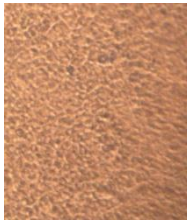
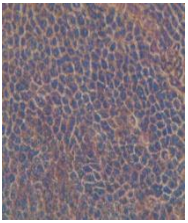
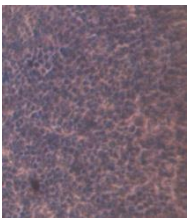
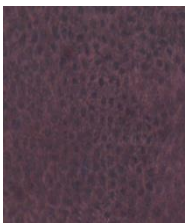
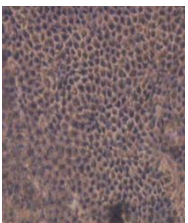
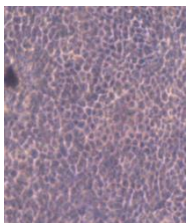
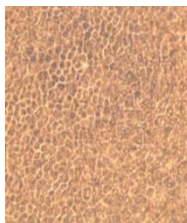
	MUESTRA 1 (M-025)		MUESTRA 2 (M-030)		MUESTRA 3 (M-031)	
TIEMPO	TOLUIDINA	TRIPAN	TOLUIDINA	TRIPAN	TOLUIDINA	TRIPAN
0 HORAS						
30 MINUTOS						
60 MINUTOS						

Figura 14. Imagen de tinciones de viabilidad celular de MA a las 0 horas, 30 minutos y 60 minutos. Elaboración propia.

6.2 Resultados de las características de las úlceras y evolución de los pacientes

Un total de 18 pacientes con úlceras complejas en pie diabético de más de 8 semanas de evolución, fueron tratados desde mayo de 2014 hasta noviembre de 2017. De los cuales 5 fueron mujeres frente a 13 hombres de edades comprendidas entre 16 y 82 años.

Presentaron DM tipo I 4 pacientes, frente a 14 pacientes con DM tipo II. Todos precisaron una descarga personalizada tipo bota: Walker, Optima o zapato postquirúrgico, y 3 de ellos su medio de transporte fue una silla de ruedas.

Los tratamientos previos incluyeron antibioterapia, exéresis óseas, cámara hiperbárica, Terapia de Presión Negativa Tópica (TPNT), revascularización y amputación del miembro inferior (Tabla 15).

En 17 pacientes (94%) se experimentó una reducción del área de la úlcera consiguiendo una epitelización completa, y en el restante se redujo el área un 75% (paciente17).

En la tabla 15 se muestran las características de los pacientes tratados con MA.

PAC	TPNT	CH	REV	HbA1c	AMC	ITB	T. TTO meses	A. P cm ²	GWM	LOC
11	NO	SI	SI	6,40	NO	0,87	7	12	III	AP
2	SI	SI	NO	4,90	NO	1	2	19,70	II	MP
3	SI	SI	SI	8,50	NO	0,80	36	3	II	MP
4	SI	NO	NO	7,40	NO	1,1	48	8,50	II	MP
5	SI	NO	SI	7,10	SI	0,90	7	35,80	IV	RP
6	SI	NO	SI	6,70	NO	0,90	18	5,50	II	MP
7	NO	NO	NO	9,50	SI	0,40	18	17,74	III	RP
8	SI	NO	NO	6	NO	1	10	0,52	II	MP
9	NO	NO	NO	10,20	SI	0,80	7	7	II	RP
10	NO	NO	NO	9,50	NO	1	12	0,70	II	AP
11	SI	NO	NO	6,90	NO	0,90	4	42,50	III	AP
12	NO	NO	NO	5,50	NO	0,50	6	5,30	II	AP
13	NO	NO	SI	8,80	NO	1,15	5	9	II	AP
14	NO	NO	NO	4,80	NO	1,27	9	4,98	III	AP
15	NO	SI	SI	7,8	NO	1	4	1,53	II	RP
16	SI	NO	NO	7	NO	0,90	2	4,52	II	AP
17	SI	NO	NO	7	NO	0,8	4	8,3	II	AP
18	NO	NO	NO	6,20	NO	0,90	5	3,60	II	AP

Tabla 15. Características de los pacientes tratados con MA y localización de las úlceras. Elaboración propia.

TPNT: Terapia de Presión Negativa Tópica, CH: Cámara Hiperbárica, REV: Revascularización, AMC: Amputación del Miembro Contralateral, ITB: Índice Tobillo Brazo, T.TTO: Tiempo de tratamiento previo a la aplicación de MA, A.P: Área previa. GWM: Grado Wagner-Meritt, LOC: localización, AP: Antepie, MP: Mediopie, RT: Retropie.

A continuación, se muestra mediante una serie de imágenes, la evolución clínica de los pacientes durante el tratamiento con MA (Figuras 15, 16, 17, 18, 19 y 20).



Figura 15. Evolución gráfica de los pacientes 1, 2 y 3 antes de la aplicación de MA, durante y con la úlcera epitelizada.



Figura 16. Evolución gráfica de los pacientes 4, 5 y 6 antes de la aplicación de MA, durante y con la úlcera



Figura 17. Evolución gráfica de los pacientes 7, 8 y 9 antes de la aplicación de MA, durante y con la úlcera epitelizada.



Figura 18. Evolución gráfica de los pacientes 10, 11 y 12 antes de la aplicación de MA, durante y con la úlcera epitelizada.



Figura 19. Evolución gráfica de los pacientes 13, 14 y 15 antes de la aplicación de MA, durante y con la úlcera epitelizada. Elaboración propia.

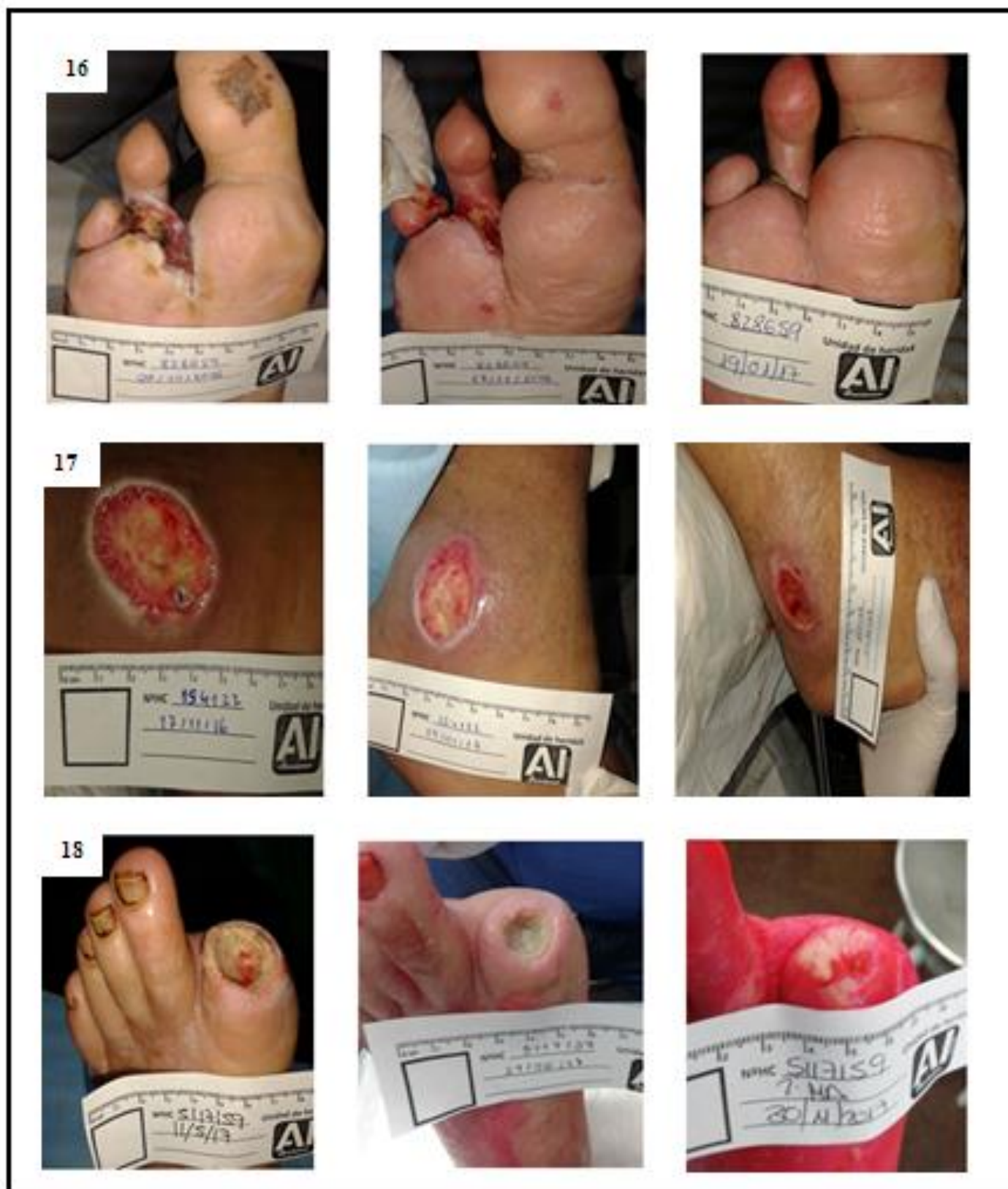


Figura 20. Evolución gráfica de los pacientes 16, 17 y 18 antes de la aplicación de MA, durante y con la úlcera epitelizada. Elaboración propia. Elaboración propia.

Antes de iniciar el tratamiento con MA:

- Todos los pacientes fueron tratados con cura ambiental y diversos apósitos comerciales según las características clínicas que presentaban las úlceras.
- En 17 pacientes fue necesaria antibioterapia sistémica y exéresis ósea parcial o total.
- En 12 pacientes se constató una hemoglobina glicosilada superior a 6,5% (Tabla 15).
- Siete pacientes presentaron un ITB entre 0,9-1, tres pacientes entre 1,1-1,3 y ocho pacientes presentaron un ITB $\leq 0,8$ (tabla 15).
- La localización de las úlceras fue 9 en antepié, 5 en mediopie y 4 en retropié (tabla 15).
- El tiempo medio de tratamiento fue de 24 meses y medio (2-48), con área media de 10,56 cm² (0,52 cm²-42,5 cm²).

Durante el tratamiento con MA observamos:

- Una reducción progresiva del tejido desvitalizado sustituyéndose por tejido sano.
- En 15 pacientes una disminución del exudado.
- En 3 pacientes (2, 11 y 13) la presencia de un exudado moderado de aspecto blanquecino, no oloroso, de consistencia serosa, sin signos clínicos de infección, no apreciado durante el tratamiento convencional.

Tres pacientes (2,11 y 18) comentaron una disminución progresiva del dolor tras cada aplicación de MA.

El tiempo medio de epitelización con MA fue de 145 días (45-392) con una media de 11,22 aplicaciones (4-40) (Figura 21).

El ritmo de epitelización, la reducción del área de las úlceras, y el número de MA aplicadas se muestra en figura 21.

En cuanto a los acontecimientos adversos relacionados con la aplicación de la MA, no se presenciaron signos clínicos de infección, a excepción de la paciente 14 en la que se realizó una exéresis ósea durante el tratamiento. No se observó tumoración ni neoplasia en el lecho, ni en la piel perilesional de las úlceras tratadas con MA.

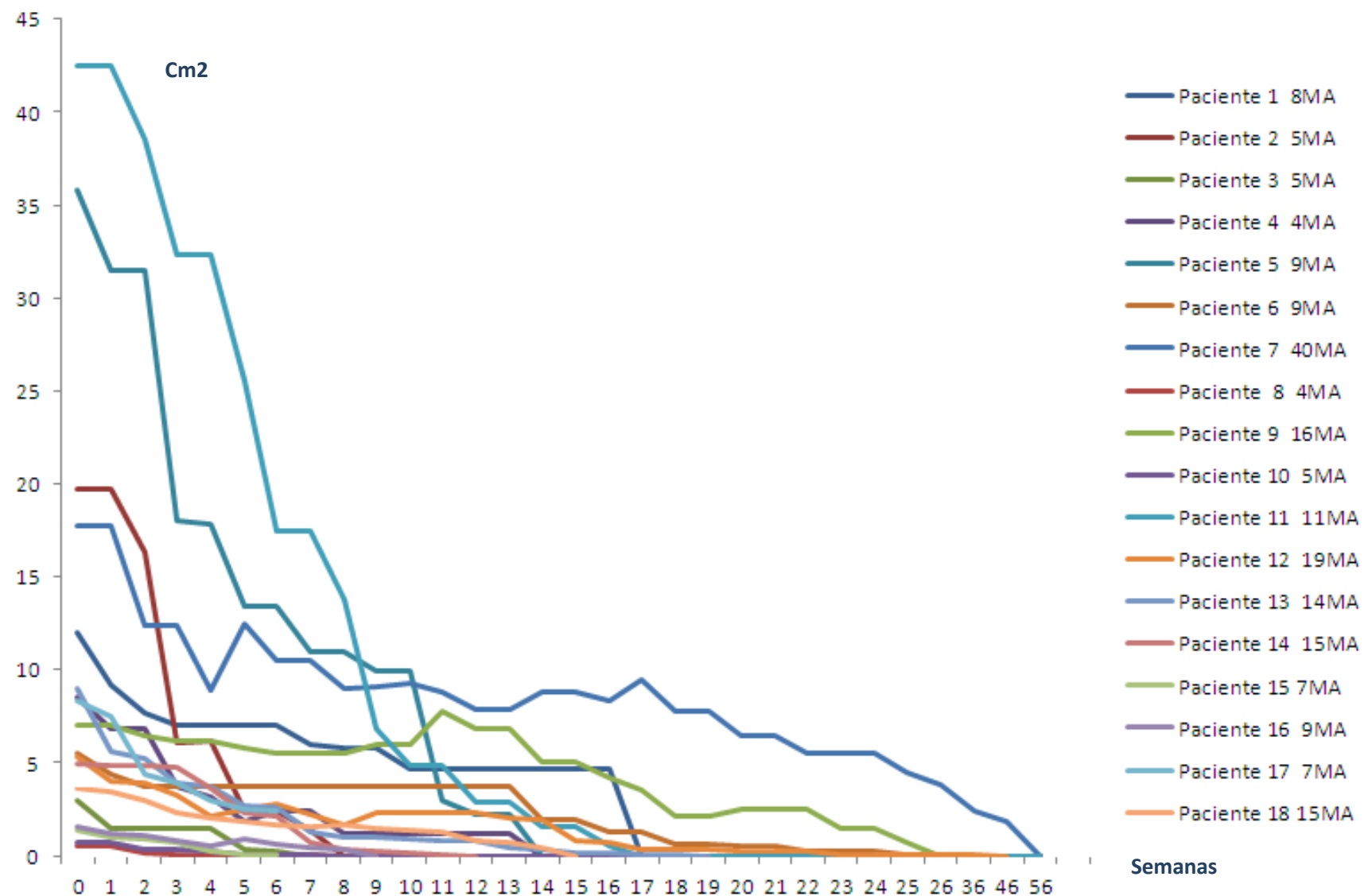


Figura 21. Disminución del área, ritmo de epitelización en semanas y número de MA aplicadas. Elaboración propia.

6.3 Resultados de los microorganismos presentes en los cultivos realizados durante el tratamiento con MA

Los microorganismos aislados en las úlceras durante la aplicación de MA, se representan en la figura 22.

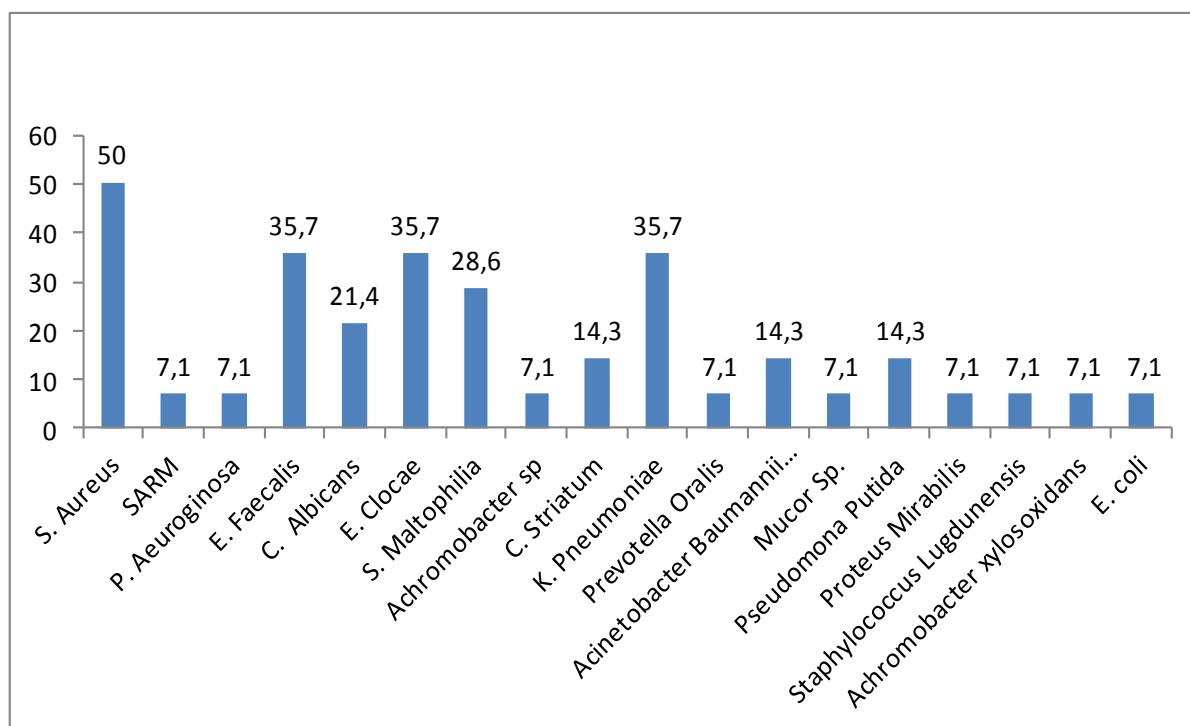


Figura 22. Porcentaje de microorganismos aislados en el total de los cultivos realizados en las úlceras de los pacientes durante el tratamiento con MA. Elaboración propia.

El microorganismo aislado con mayor frecuencia en este tipo de úlceras fue el *S. Aureus* seguido de *E. Faecalis*, *E. Clocae* y *K. Neumoniae* dato que coincide con la bibliografía revisada y que se discutirá posteriormente en la discusión del trabajo.

6.4 Resultados estadísticos

Aplicando el test de Pearson observamos una correlación significativa ($p < 0,004$) e inversa entre el ITB y el número de membranas ($p: -0,637$) y una correlación significativa inversa ($p < 0,0001$) entre el ITB y los días de epitelización ($p: -0,765$). Lo que indica que a medida que descienden los valores de ITB aumenta el tiempo de epitelización y el número de MA aplicadas. Además, se establece una correlación entre la localización de las úlceras, el número de membranas y el tiempo de epitelización, siendo la zona posterior del pie (talón) la localización de aquellas úlceras que más tardaron en epitelizar y mayor número de membranas requirieron.

6.5 Resultados de los seguimientos de las úlceras en los pacientes

Tras el seguimiento de los pacientes al año y dos años de epitelizar sus heridas, en dos pacientes se ocasionaron nuevas úlceras (paciente 7 y paciente 9), dando lugar en un paciente a la amputación del miembro (paciente 7) y el otro paciente (paciente 9) continúa en tratamiento con TPNT y curas ambientales.

Dos pacientes presentaron una recidiva de su úlcera tras un mes (paciente 3) y tres meses (paciente 8) de suspender la aplicación de MA, el paciente 3 continúa en tratamiento y la úlcera del paciente 8 en la actualidad se encuentra epitelizada. El resto de pacientes continúan con sus úlceras epitelizadas y con un buen aspecto de la piel. No se aprecia cicatriz hipertrófica, queloidea ni dolorosa en ningún caso.

El paciente 17 continúa con diversos tratamientos sin la epitelización de su úlcera.

En las siguientes imágenes, se muestra la evolución gráfica de los seguimientos de los pacientes con úlceras tratadas con MA, a los 6 meses y al año del tratamiento (figuras 23, 24 y 25).



Figura 23. Evolución gráfica de los seguimientos de los pacientes 1, 2, 4, 5 y 6 al año y del paciente 3 a los seis meses. Elaboración propia.

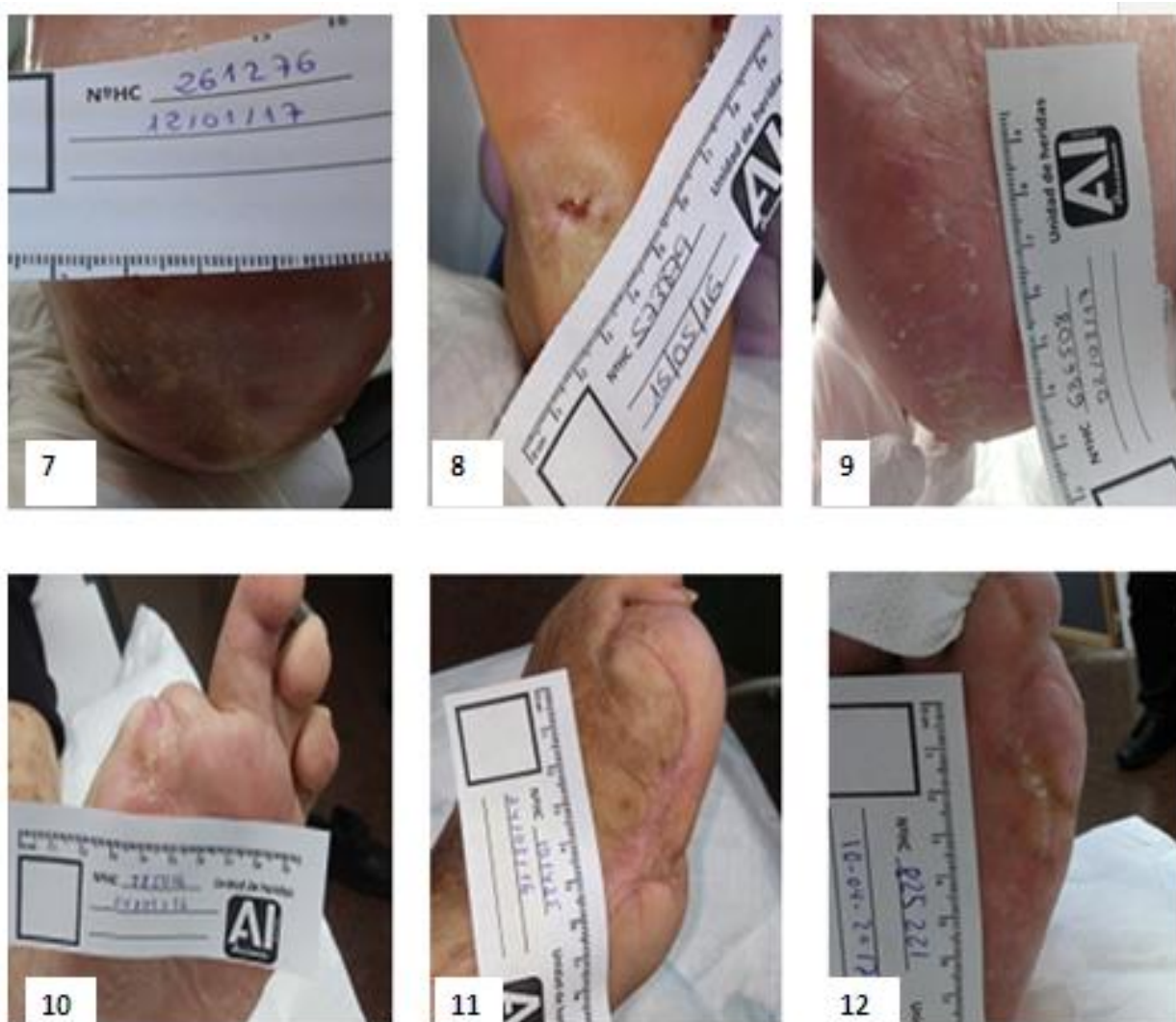


Figura 24. Evolución gráfica de los seguimientos de los pacientes 7, 9, 10, 11 y 12 al año y del paciente 8 a los seis meses. Elaboración propia.



Figura 25. Evolución gráfica de los seguimientos de los pacientes 13, 14, 15, 16 y 18 al año y del paciente 17 a los seis meses. Elaboración propia.

7 DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

7.1 Reducción del área de la herida

En este estudio se exponen los resultados del uso de MA criopreservada para el tratamiento de una serie de pacientes con úlceras complejas de pie diabético. A pesar de que las características de las úlceras en los pacientes fueron diferentes, el resultado del tratamiento con MA fue favorable en todos ellos.

En todos los casos se observó una disminución del área de la herida, dato que está en concordancia con las observaciones de otros autores (Zelen, CM.)[135] que utilizó MA deshidratada para demostrar la eficacia de este tratamiento en 25 pacientes diabéticos con úlceras neuropáticas frente a un grupo control tratado con suero fisiológico, obteniendo una resolución de las úlceras en el 92% de los pacientes tratados en el grupo de MA a las seis semanas de tratamiento (Werber,B.) [136], también aportó datos en su estudio sobre la reducción del área en 20 pacientes con úlceras crónicas de Pie Diabético tratadas con MA líquida obteniendo una curación del 90% de las heridas a las 12 semanas de tratamiento.

A pesar de que el hecho clínico más significativo fue la reducción del área de la herida, en nuestra serie de casos aquellos pacientes con menor afectación sensitiva manifestaron una disminución sustancial del dolor, dato corroborado en la bibliografía como una propiedad

biológica de la MA también comentado Alsina, M. [137] en una serie de tres pacientes con úlceras venosas donde se aplicó MA fresca.

7.2 Disminución del tejido desvitalizado

El tejido desvitalizado, formado en la etapa de la inflamación de la herida y que está constituido por colágeno, fibrina, neutrófilos, macrófagos, bacterias y detritus celulares que se adhieren al lecho de la herida e impiden la resolución de la misma, se reduce paulatinamente. No encontramos datos en la bibliografía que aclaren posibles mecanismos de actuación de la MA en este tejido. No obstante, el desbridamiento cortante que realizamos en los pacientes que presentan tejido esfacelado es un mecanismo que sirve de ayuda y mejora la acción desbridante de la MA.

En aquellos pacientes donde no realizamos desbridamiento cortante también observamos una reducción del esfacelo tras la aplicación de MA, lo que quizás pueda estar en relación con la supresión de dos mediadores proinflamatorios, como son la interleuquina-1 α y la interleucina-1 β por el estroma de la matriz de la MA, lo que reduciría la inflamación y sus productos de desecho.

7.3 Regulación del exudado

Existe controversia en cuanto al exudado, ya que autores como Alsina-Gibert, M. [137] reportan un aumento del exudado en uno de los tres pacientes tratados con MA fresca a diferencia de Vivekananda BR. [138] que en su estudio de 200 pacientes con úlceras crónicas de diversas etiologías en las que aplicó MA preservada en glicerol, reporta una disminución del exudado en los pacientes tratados con MA frente al grupo control en los que el exudado apareció en el 70% de los pacientes.

En nuestra serie, apareció exudado a la semana de aplicación de la MA en un 20% de los pacientes que se fue regulando de forma paulatina tras las siguientes aplicaciones, dato que sugiere que quizás la MA mediante la secreción de factores moleculares induzca cambios electrolíticos favorables en el proceso de cicatrización de heridas.

7.4 Reducción del dolor

En nuestra serie, tres pacientes reportaron una disminución del dolor tras la aplicación de MA, tratamiento utilizado por Eskandarlou, M. [133] en pacientes con quemaduras para conseguir la epitelización y la disminución del dolor. A pesar de que esta variable no fue recogida, ya que los pacientes presentaban neuropatía sensitiva en mayor o menor grado.

7.5 Disminución de la infección

En cuanto a los datos obtenidos tras los cultivos microbiológicos realizados durante el tratamiento con MA, se evidencia un mayor porcentaje de bacterias Gram positivas y en particular un aumento de *Estafilococcus Aureus*, dato que coincide con la bibliografía revisada, que indica un predominio de patógenos cocos Gram positivos que producen infecciones en pacientes con pie diabético [139].

En un estudio utilizando técnicas moleculares para investigar la etiología de la úlcera crónica infectada, el *S. Aureus* fue la bacteria más frecuente [140] encontrando otros microorganismos aerobios y facultativos como *Morganella Morganii*, *Enterococcus Faecalis*, *Citrobacter* y *Haemophilus*. Entre los anaerobios, los más comunes fueron: de la especie de *Anaerococcus Prevotii*, *Bacteroides Fragilis*, *Finnegoldia Magna*, *Peptoniphilus*, *Clostridium*, y *Veillonella* [140]. En la fascitis necrotizante y gangrena, los microorganismos aislados más comunes fueron cocos Gram positivos facultativos, enterobacterias, y bacilos Gram negativos fermentadores y anaerobios [49, 140].

En infecciones de Pie Diabético, un estudio llevado a cabo en España [141] se mostraron resultados similares. En nuestros casos, la mayoría de los cultivos fueron monomicrobianos; y el *S. Aureus* fue el microorganismo más prevalente seguido por las enterobacterias y *P. Aeruginosa*. La principal bacteria con problemas de resistencia a los

antibióticos en las infecciones del pie diabético fue el *Staphylococcus Aureus* Resistente a la Metilina (SARM), que se cultivó en el 12% de los casos [141].

Las bacterias aerobias aisladas encontradas en los cultivos de las úlceras tratadas en nuestros pacientes con mayor frecuencia fueron: *S. Aureus* (50%), *E. Faecalis* (35,7 %), *E. Clocae* (35,7%), *K. Pneumoniae* (35,7), *C. Albicans* (21,4%), *S. Maltophilia* (28,6%) (Figura 23). Un 7,1% de las cepas de *S. Aureus* fueron resistentes a la metilina (SARM) lo que significa que esta bacteria estaba presente en el 7,1 % de las muestras clínicas analizadas.

Nuestros datos sugieren que la MA contribuye a la protección de la úlcera frente a infecciones, ya que los pacientes con cultivos positivos tras las aplicaciones de MA no desarrollaron infección clínica, y con tratamientos anteriores si habían desarrollado signos clínicos de infección. Estos datos coinciden con los de Zelen, CM. [142] que reporta una reducción de infecciones en el grupo tratado con MA frente a los pacientes tratados con el tratamiento estándar de curas con diferentes apósitos.

7.6 Regulación del tejido de granulación

En nuestra serie, observamos que la MA induce la granulación en úlceras crónicas, apareciendo un lecho vascularizado sano, dato que aportan otros autores como Vivekananda, BR. [138], que lo atribuye a las propiedades angiogénicas de la MA, aunque este autor establece

una distinción entre las capas de la MA y su aplicación por una u otra capa en función de los efectos deseados, aspecto que no hemos considerado en nuestros pacientes.

Dos de los pacientes (paciente 2 y paciente 11) desarrollaron síntomas claros de hipergranulación previa al tratamiento con MA que fue regulada de forma paulatina tras la aplicación de MA. Poco se sabe sobre la hipergranulación en los pacientes diabéticos [143]. El exceso de humedad, la fricción, el desequilibrio del colágeno, el exudado excesivo, las infecciones y un lecho de la herida mal vascularizado han sido señalados como rasgos comunes de heridas que desarrollan hipergranulación [143-145].

Las úlceras del pie diabético son propensas a la infección debido al suministro inadecuado de oxígeno y nutrientes a la úlcera, aumentando así el potencial de formación de tejido anormal, como la hipergranulación.

La hipergranulación se ha tratado tradicionalmente con nitrato de plata, desbridamiento quirúrgico, corticoides y cirugía con láser [143].

En dos pacientes de nuestra serie que habían desarrollado hipergranulación, la MA disminuyó este exceso de granulación después de sólo dos aplicaciones. El efecto positivo de la MA sobre las úlceras hipergranuladas podría explicarse por las propiedades antiinflamatorias [94,146, 147] de esta que actuarían como un agente regulador durante la inflamación. Así pues, la MA parece una buena opción terapéutica para las úlceras diabéticas hipergranuladas.

7.7 Angiogénesis

El significado clínico de la producción adecuada de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) durante la reparación de la herida se ha demostrado repetidamente [148].

Los niveles de proteína VEGF activa, tienden a ser anormalmente bajos en individuos con heridas crónicas no cicatrizadas como las observadas comúnmente en pacientes diabéticos. Las úlceras del Pie Diabético son causadas por la disminución del flujo sanguíneo y por tanto, la vascularización insuficiente de la herida, derivada de la baja actividad del VEGF, probablemente contribuye a retrasar el proceso de reparación. Del mismo modo, los fármacos que bloquean la actividad del VEGF, que se utilizan para tratar múltiples tipos de cáncer, implican un riesgo significativo de dificultar la cicatrización de heridas [148].

En general, los datos de laboratorio y los estudios clínicos indican que son necesarios niveles adecuados de VEGF para la reparación eficiente de la herida [148]. Roelen, DL. et al. [149], analizando la producción de citoquinas en cultivos mixtos de células humanas y células madre mesenquimales de MA humanas, observaron un aumento de VEGF en estos medios de cultivo [149].

Dado que la MA produce VEGF en gran cantidad, es muy probable que tenga un efecto positivo en la regulación de la angiogénesis en el lecho vascular. De hecho, nuestros pacientes,

tras la aplicación de MA, mostraron un lecho vascular de la herida más revitalizado y con mejor aspecto macroscópico, lo que quizás indica un posible mecanismo de acción de la MA.

Sin embargo, con respecto a la angiogénesis del lecho vascular, existe controversia entre las propiedades antiangiogénicas y promotoras de angiogénesis de MA. Niknejad, H. [150] mostró ambas propiedades dependiendo de la cara por la que se aplique la MA.

Nosotros, en la observación de diferentes úlceras del pie diabético, hemos verificado que la aplicación de MA con frecuencia produce una mejora sustancial en la vascularización del lecho de la herida, aunque no medimos la cantidad de VEGF. En estudios posteriores del grupo determinaremos la cantidad de VEGF presente en las biopsias de herida previos y posterior al tratamiento con MA, y otro marcador endotelial que sería el Von Willebrand factor (vWF) presente en el endotelio de los nuevos vasos en los tejidos (angiogénesis) mediante PCRs cuantitativas.

En un estudio reciente realizado por Zheng, Y. et al [151], ratones diabéticos con heridas fueron tratados con MA micronizada y criopreservada, que promovió la cicatrización, redujo la inflamación y estimuló determinadas interleuquinas produciendo una migración de macrófagos y células progenitoras CD34 +, aumentando así la neovascularización.

7.8 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

En grandes heridas crónicas, nuestro grupo [147, 152,153] ha observado que la MA favorece la epitelización mediante la modulación del programa genético inducido por TGF- β , estimulando así la proliferación y migración de queratinocitos en dichas heridas. Un gen clave para entender este efecto es c-Jun [152], proteína que está implicada en la migración celular [154]. La expresión y activación de c-Jun es inducida al máximo por el sinergismo de una vía de señalización activa de TGF- β y MA [152]. Es necesaria más investigación para determinar si ambos factores contribuyen a los eventos celulares y moleculares que, actuando localmente, modificarían el ambiente para revertir el deterioro, y estimularían una reepitelización efectiva de las úlceras complejas del Pie Diabético.

7.9 Acontecimientos adversos

En un paciente (paciente 14) se procedió a la exéresis de un fragmento óseo del quinto metatarsiano por osteomielitis, confirmada por anatomía patológica, durante el tratamiento con MA. Esta complicación podría haber sido causada por una infección ósea sin signos clínicos de infección aparente, no detectada previamente al tratamiento con MA, ya que la exposición ósea estaba presente y el “probe to bone” fue positivo antes del tratamiento.

7.10 Otros aspectos a destacar:

Hemoglobina glicosilada

En un 72% de los pacientes se constató una hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c) superior a 6,5% (valor normal <6,5%) antes del inicio del tratamiento con MA, dato que contribuye a la evolución desfavorable de las úlceras en estos pacientes. Por lo que es aconsejable un estrecho control en estos pacientes para potenciar un buen control glucémico. De hecho, 3 de los 4 pacientes de la serie en los que se realizaron amputaciones del miembro contralateral tenían HbA1c elevadas.

En estudios posteriores, con más casuística, se estudiarán las correlaciones del control de la HbA1c con los diferentes parámetros evolutivos de la herida local y las complicaciones, así como la posible correlación del tratamiento de MA con las glucemias inmediatamente posteriores a su implantación.

Grado de arteriopatía e isquemia

El pie isquémico se manifiesta por dolor de reposo, ulceración o gangrena en pacientes con diabetes, y este requiere tratamiento. La presencia frecuente de neuropatía influye fuertemente en la presentación de la afección con lesiones más graves que en el paciente no diabético. La presencia de Enfermedad Arterial Periférica (PAD) aumenta la isquemia del nervio, resultando en empeoramiento y neuropatía. Además, tales lesiones arteriales pueden

progresar sin ser detectadas. En consecuencia, los pacientes diabéticos con PAD tienen más probabilidades de presentar úlceras que los paciente no diabéticos [155].

El ITB se define, como la relación de la sangre sistólica de presión en el tobillo dividida por la presión sistólica del brazo, este índice debe realizarse en pacientes de 50 o más años que tienen diabetes. Si es normal (0,8-1,1), la prueba debe repetirse cada 5 años.

Pacientes de 50 años de edad que tengan otros factores de riesgo por ejemplo; fumar, hipertensión, hiperlipidemia o pacientes diabéticos de más de 10 años de evolución las recomendaciones dicen que debería realizarse de forma anual [155].

Un dato comunicado en la bibliografía [136] es que la arteriopatía e isquemia contribuyen a la persistencia y fallo en la curación de heridas. Nosotros hemos serie corroboramos este dato y encontramos una clara correlación inversa: a medida que descienden los valores de ITB, aumenta el tiempo de epitelización de las úlceras [136].

La isquemia crítica no revascularizable sintomática en pacientes con PD es un criterio de amputación. Es muy notable que a pesar de ello, en dos de nuestros pacientes que presentaron estas características, aplicamos MA y uno de ellos en la actualidad conserva el miembro inferior y parte del pie.

Recientemente, en nuestro hospital hemos puesto en marcha un tratamiento por uso compasivo para pacientes con Isquemia Crítica de Miembro Inferior no revascularizable, con células mononucleadas (CMN) autólogas de médula ósea (MO) inyectadas en el musculo gastrocnemio de ambas piernas para valorar el grado de neovascularización.

7.11 Dificultades asociadas al procedimiento

A pesar de que la MA es un tejido fácil de obtener y sin problemas éticos para su uso, en su aplicación práctica es necesario disponer de infraestructuras adecuadas tales como una Unidad de Producción Celular (UPC) acreditada que cumplen con la normativa GMP (Good Manufacturing Practice) y cuente con la autorización de la AEMPS requerida para la producción de MA.

Personal con experiencia para el rápido procesamiento de este tejido, y un Servicio de Ginecología y Obstetricia en el que exista un volumen suficiente de cesáreas programadas en pacientes sanas para obtener las MA.

En el caso de su empleo por uso compasivo, es absolutamente necesaria la aprobación de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) de forma individual para cada paciente ya que se trata de un medicamento en investigación con características especiales, lo que precisa unos exigentes trámites administrativos y un seguimiento muy preciso y continuado de la evolución clínica y los efectos adversos potenciales. La Farmacia

hospitalaria ha de registrar el tratamiento de estos pacientes ya que de forma semanal reabastece mediante la aplicación de la AEMPS cada lote de MA aplicado a cada paciente.

7.12 Limitaciones

Dentro de las limitaciones con las que nos hemos encontrados están:

- Falta de Ensayos Clínicos aleatorizados con MA humana criopreservada
- Reducción en el número de casos de los pacientes tratados
- Falta de datos disponibles
- Pérdida de seguimiento de los pacientes

8 CONCLUSIONES

De nuestro estudio se concluye, que el tratamiento con MA humana criopreservada:

- Es seguro en pacientes con úlceras de Pie Diabético.
- Se ha demostrado eficaz en el 94% de los casos, logrando la cicatrización de las úlceras de Pie Diabético en 17 de los 18 pacientes tratados.
- Ha sido eficaz incluso en heridas de larga evolución que habían fallado a tratamientos previos.
- La presencia de gérmenes en las úlceras no ha sido un factor que haya alterado los efectos favorables producidos por la MA.
- Existe una correlación inversa significativa entre el ITB y el tiempo hasta la epitelización, así como con el número de MA necesarias para conseguirla. La correlación negativa también es patente cuando la localización de la úlcera es en el talón.
- Puede ser un arma terapéutica adicional a los cuidados multidisciplinarios que estas heridas requieren, y contribuir a ahorrar amputaciones en estos enfermos.
- Proporciona una mejor calidad de vida ya que las curas no son dolorosas y se pueden realizar de forma semanal y ambulatoria.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Tebar FJ, Ferrer M. Concepto, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. In: Tebar FJ, Escobar F, editors. *la Diabetes Mellitus en la práctica clínica*. Madrid: Medica Panamericana; 2009. p. 1-9.
2. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes. 2016; Available at: <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>.
3. Fundación redGDPS. Incidencia de la diabetes tipo 2 en España 2018: estudio di@bet.es incidencia.2018. Disponible en: <http://www.redgdps.org/estudio-de-incidencia-de-la-diabetes-en-espana-2018-estudio-diabetes-incidencia/>.
4. Ben-Othman N, Courtney M, Vieira A, Pfeifer A, Druelle N, Gjernes E, et al. From pancreatic islet formation to beta-cell regeneration. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;101(1):1-9.
5. Chang YC, Hee SW, Hsieh ML, Jeng YM, Chuang LM. The Role of Organelle Stresses in Diabetes Mellitus and Obesity: Implication for Treatment. *Anal Cell Pathol*. 2015;(1):1-14.
6. Triana ME. La hiperglucemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*.2001;2(2):131-141.
7. Rubio Cabezas O, Argente J. Diabetes mellitus: formas de presentación clínica y diagnóstico diferencial de la hiperglucemia en la infancia y adolescencia. *An Pediatr*. 2012;77(5):344-346.
8. Huici MJ, Herrera MT, Alvarez AI, Dominguez, I, Infante R, Leon-Justel A et al. Estudio de autoanticuerpos en el inicio de la diabetes autoinmune en nuestro medio mediante ELISA. *Rev Lab Clin*. 2011;4(2):77-83.
9. Deepthi B, Sowjanya K, Lidiya Bea. A Modern Review of Diabetes Mellitus: An Annihilatory Metabolic Disorder. *Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology*. 2017;3(1):1-5.
10. Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, De Nigris V, Ceriello A. The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients*. 2016;8(5):1-3. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/nu805031010>.

11. Mahmooda S, Levy D, Vasanb S R. The Framingham Heart Study and the Epidemiology of Cardiovascular Diseases: A Historical Perspective. *Lancet*.2014;383(9921):999-1008.
12. Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, et al. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*.2015;16(10):25234-25263.
13. Tsai CF, Anderson N, Thomas B, Sudlow CL. Comparing Risk Factor Profiles between Intracerebral Hemorrhage and Ischemic Stroke in Chinese and White Populations: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016 Mar 18;11(3):e0151743.
14. Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev neurol*. 2001;33(5):455-464.
15. Cooke JP, Chen Z. A compendium on peripheral arterial disease. *Circ Res* 2015;116(9):1505-1508.
16. American Diabetes Association. Peripheral Arterial Disease in People With Diabetes. *Diabetes care*. 2003;26(12):3333-3341.
17. Fontaine R, Kim M, Kiendy R. Surgical Treatment of Peripheral Circulation Disorders. *Helvetica Chimica Acta*. 1954;21(5-6):499-533.
18. Hardman RL, Jazaeri O, Yi J, Smith M, Gupta R. Overview of classification systems in peripheral artery disease. *Semin Intervent Radiol*.2014;31(4):378-388.
19. Blanes JJ, Clara A, Lozano F, Alcalá D, Doiz E, Merino R et al. Documento de consenso sobre el tratamiento de las infecciones en el pie del diabético. *Angiologia*.2012;64(1):31-59.
20. Al-Qaisi M, Nott DM, King DH, Kaddoura S. Ankle brachial pressure index (ABPI): An update for practitioners. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:833-841.
21. O'Loughlin A, McIntosh C, Dinneen SF, O'Brien T. Review paper: basic concepts to novel therapies: a review of the diabetic foot. *Int J Low Extrem Wounds*.2010;9(2):90-102.
22. Makhdoomi K, Mohammadi A, Yekta Z, Aghasi MR, Zamani N, Vossughian S. Correlation between ankle-brachial index and microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Iran J Kidney Dis* 2013 May; 7(3):204-209.

23. Guindo J. Métodos diagnósticos de la enfermedad arterial periférica. Importancia del índice tobillo-brazo como técnica de criba. *Rev Esp Cardiol.* 2009; 9:11-17.
24. Chang AA, Hong T, Ewe SY, Bahrami B, Broadhead GK. The role of aflibercept in the management of diabetic macular edema. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9:4389-4396.
25. Kim SS, Kim JH, Kim IJ. Current Challenges in Diabetic Nephropathy: Early Diagnosis and Ways to Improve Outcomes. *Endocrinol Metab.* 2016; 31(2):245-253.
26. Kim SS, Kim JH, Kim IJ. Response: Fibroblast growth factor 23 resistance is probably involved in the mechanism of type 2 diabetes-induced nephropathy. *J Diabetes Complications.* 2016;30(6):1204.Disponible en:<https://doi.org/10.016/j.jdiacomp.2016.04.016>.
27. National Kidney Foundation. Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update. *Am J Kidney Dis* 2012; 60(5):850-886.
28. Kim SG, Hahm JR, Kim DK, Cho SR, Choi DS. Assessment of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus treated with metformin-sulfonylurea combination: Results of a multicenter, cross-sectional, observational study in Korea. *J Diabetes Investig.* 2015; 6(3):317-324.
29. Won JC, Park TS. Recent Advances in Diagnostic Strategies for Diabetic Peripheral Neuropathy. *Endocrinol Metab.* 2016; 31(2):230-238.
30. Mendoza MA, Ramirez MC. Abordaje multidisciplinario del pie diabético. *Rev Endocrinología y Nutrición.* 2005; 13(4):165-179.
31. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA.* 2005; 293(2):217-228.
32. Mete T, Aydin Y, Saka M, Cinar Yavuz H, Bilen S, Yalcin Y, et al. Comparison of efficiencies of michigan neuropathy screening instrument, neurothesiometer, and electromyography for diagnosis of diabetic neuropathy. *Int J Endocrinol* 2013. doi: 10.1155/2013/821745.
33. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA.* 2005; 293(2):217-228.
34. Tuttolomondo A, Maida C, Pinto A. Diabetic foot syndrome as a possible cardiovascular marker in diabetic patients. *J Diabetes Res.* 2015. doi:10.1155/2015/268390.

35. Blanes JI, Representatives of Spanish Society of Surgeons (ACS), Representatives of Spanish Society of Angiology and Vascular Surgery (SEACV), Representatives of Spanish Society of Emergency Medicine (SEMES), Spanish Internal Medicine Society (SEMI), Representatives of Spanish Society of Critical Care Medicine and Coronary Units (SEMICYUC), et al. Consensus document on treatment of infections in diabetic foot. *Rev Esp Quimioter*.2011; 24(4):233-262.
36. Cornell S, Dorsey VJ. Diabetes pharmacotherapy in 2012: considerations in medication selection. *Postgrad Med*.2012; 124(4):84-94.
37. Beckmann KH, Meyer-Hamme G, Schroder S. Low level laser therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. *Evid Based Complement Alternat Med*.2014; 1-9.Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1155/2014/626127>.
38. Lavery LA, Armstrong DG, Harkless LB. Classification of diabetic foot wounds. *Ostomy Wound Manage*.1997; 43(2):44-53.
39. Hesman G, Farouk O, Abdel-Raouf A. Effect of Mechanical Vibration Therapy on Healing of Foot Ulcer in Diabetic Polyneuropathy Patients. *Journal of American Science*.2013; 9(7):76-87.
40. Schaper NC. Diabetic foot ulcer classification system for research purposes: a progress report on criteria for including patients in research studies. *Diabetes Metab Res Rev*.2004; 20:90-95.
41. Schaper NC, Van Netten JJ, Apelqvist J, Lipsky BA, Bakker K, International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). Prevention and management of foot problems in diabetes: a Summary Guidance for Daily Practice 2015 based on the IWGDF Guidance Documents. *Diabetes Metab Res Rev*.2016; 32 Suppl 1:7-15.
42. Becker F, Robert-Ebadi H, Ricco JB, Setacci C, Cao P, de Donato G, et al. Chapter I: Definitions, epidemiology, clinical presentation and prognosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*.2011; 42 Suppl 2:4-12.
43. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *Int Angiol*.2007; 26(2):81-157.
44. Pernes JM, Auguste M, Borie H, Kovarsky S, Bouchareb A, Despujole C, et al. Infrapopliteal arterial recanalization: A true advance for limb salvage in diabetics. *Diagn Interv Imaging*.2015; 96(5):423-434.
45. Apelqvist J. Diagnostics and treatment of the diabetic foot. *Endocrine*.2012; 41(3):384-397.

46. Bjornsdottir SG, M. Risk Factors for Acute Cellulitis of the Lower Limb: A Prospective Case-Control Study. 2005; 41:1416-1422.
47. Martinez Gómez DA. Cuidados del pie diabético. 2nd ed. Madrid: Aran. Madrid; 2005.
48. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care*.2015; 4(9):560-582.
49. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. *J Am Podiatr Med Assoc*.2013; 103(1):2-7.
50. Vardakas KZ, Horianopoulou M, Falagas ME. Factors associated with treatment failure in patients with diabetic foot infections: An analysis of data from randomized controlled trials. *Diabetes Res Clin Pract*.2008; 80(3):344-351.
51. Lipsky BA. Evidence-based antibiotic therapy of diabetic foot infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*.1999; 26(3-4):267-276.
52. Morey-Vargas OL, Smith SA. BE SMART: strategies for foot care and prevention of foot complications in patients with diabetes. *Prosthet Orthot Int*.2015; 39(1):48-60.
53. Monteiro-Soares M, Boyko EJ, Ribeiro J, Ribeiro I, Dinis-Ribeiro M. Predictive factors for diabetic foot ulceration: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28(7):574-600.
54. Mayfield JA, Reiber GE, Sanders LJ, Janisse D, Pogach LM, American Diabetes Association. Preventive foot care in diabetes. *Diabetes Care*.2004; 27 Suppl 1:63-4.
55. Bakker K, Apelqvist J, Schaper NC, International Working Group on Diabetic Foot Editorial Board. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. *Diabetes Metab Res Rev*.2012; 28 Suppl 1:225-231.
56. Grayson ML, Gibbons GW, Balogh K, Levin E, Karchmer AW. Probing to bone in infected pedal ulcers. A clinical sign of underlying osteomyelitis in diabetic patients. *JAMA*.1995; 273(9):721-723.
57. Lavery LA, Armstrong DG, Peters EJ, Lipsky BA. Probe-to-bone test for diagnosing diabetic foot osteomyelitis: reliable or relic? *Diabetes Care*.2007; 30(2):270-274.

58. European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Wound Bed Preparation in Practice. London. 2004. Disponible en:http://www.woundsinternational.com/media/issues/87/files/content_49.pdf
59. Real JT, Gonzalez R. Valoración clínica del riesgo de lesión en el pie diabético. *Av Diabetol*.2006; 22:32-38.
60. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med*.2006; 23(6):594-608.
61. Blakytyn R, Jude EB. Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*.2009; 8(2):95-104.
62. Caruso M, Evangelista M, Parolini O. Human term placental cells: phenotype, properties and new avenues in regenerative medicine. *Int J Mol Cell Med*. 2012; 1(2):64-74.
63. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol*.2010; 25(1):91-98.
64. Carpenter JR, Branch DW. Collagen vascular diseases in pregnancy. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson, J.L. et al, eds. *Obstetrics: 7th ed*. Philadelphia,PA: Elsevier, editors. Normal and Problem Pregnancies; 2017. p. 46.
65. Gupta A, Kedige SD, Jain K. Amnion and Chorion Membranes: Potential Stem Cell Reservoir with Wide Applications in Periodontics. *Int J Biomater*.2015. doi: 10.1155/2015/274082.
66. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2008; 15:88-99.
67. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea*.1999; 18(1):73-79.
68. Fairbairn NG, Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*.2014; 67(5):662-675.
69. Tseng SC, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol*.1997; 124(6):765-774.
70. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol*.1998; 82(3):235-240.

71. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol.*1989; 93(3):372-378.
72. Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science.*1995; 267(5199):891-893.
73. Kasi N, Durrani KM, Siddiqui MA. Human amniotic membrane as a versatile biological dressing--a preliminary report. *J Pak Med Assoc.*1987; 37(11):290-292.
74. Gruss JS, Jirsch DW. Human amniotic membrane: a versatile wound dressing. *Can Med Assoc J.*1978; 118(10):1237-1246.
75. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000 Mar; 20(3):173-177.
76. Grueterich M, Tseng SC. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol.*2002;120(6):783-790.
77. Datta H, Sarkar K, Chatterjee PR. Amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *J Indian Med Assoc.*2004; 102(12):726-729.
78. Alcaraz A, Mrowiec A, Insausti CL, Bernabe-Garcia A, Garcia-Vizcaino EM, Lopez-Martinez MC, et al. Amniotic Membrane Modifies the Genetic Program Induced by TGFss, Stimulating Keratinocyte Proliferation and Migration in Chronic Wounds. *PLoS One.*2015; 10(8):1-28. doi: :10.1371/journal.pone.0135324
79. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol.*1999; 179(3):325-335.
80. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.*2000; 19(3):348-352.
81. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res.*2000; 70(3):329-337.
82. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.*2001; 85(4):444-449.

83. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*.2001; 20(4):408-413.
84. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma.*Cornea*.2005;24(2):206-212.
85. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*.2007; 28(2-3):161-169.
86. King AE, Critchley HO, Sallenave JM, Kelly RW. Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. *J Clin Endocrinol Metab*.2003; 88(9):4426-4431.
87. Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry*.2001; 66(1):1-7.
88. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*.2005; 16(4):233-240.
89. Romero R, Gomez R, Galasso M, Mazor M, Berry SM, Quintero RA, et al. The natural interleukin-1 receptor antagonist in the fetal, maternal, and amniotic fluid compartments: the effect of gestational age, fetal gender, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol*.1994; 171(4):912-921.
90. Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea*.2006; 25(10 Suppl 1):53-8.
91. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*.2008; 26(2):300-311.
92. Moraleda Jiménez JM. La terapia celular en enfermedades no hematológicas: ¿sueño o realidad? *Revista de hematología Mexicana*.2011; 12(4):239-241.
93. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*.2008; 15:88-99.
94. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*. 2007; 105(3):215-228.

95. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, et al. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*.2000; 22(6):714-721.
96. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Nov; 191(5):1678-1687.
97. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2001; 42(7):1539-1546.
98. Peternella S, Sicco A, Carin Kleijburg V, Godelieve M.J.S. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells*. 2004; 22:1338-1345.
99. Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Rendal-Vazquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Tissue Eng Part C Methods*.2011; 17(1):49-59.
100. Zhou K, Koike C, Yoshida T, Okabe M, Fathy M, Kyo S, et al. Establishment and characterization of immortalized human amniotic epithelial cells. *Cell Reprogram*.2013; 15(1):55-67.
101. Pelekanos RA, Sardesai VS, Futrega K, Lott WB, Kuhn M, Doran MR. Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue. *J Vis Exp*.2016;(112). doi: 10.3791/54204.
102. Miki T, Marongiu F, Ellis E, C Strom S. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*.2007; 3:1.doi: 10.1002/9780470151808.sc01e03s3.
103. Insausti C, Blanquer M, Majado MJ, Insausti A, Moraleda J. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. *Rev Hematol Mex*.2011; 4(12):276-286.
104. Ochsenbein-Kolble N, Bilic G, Hall H, Huch R, Zimmermann R. Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair. *J Perinat Med*.2003; 31(4):287-294.
105. Miki T, Strom SC. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev*.2006; 2(2):133-142.

106. Insausti CL, Blanquer M, Garcia-Hernandez AM, Castellanos G, Moraleda JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning*.2014; 7:53-63.
107. Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med*.2006;1(4):497-509.
108. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*.2005; 23(10):1549-1559.
109. Insausti C, Rodriguez M, Castellanos G, Moraleda JM. Propiedades inmunomoduladoras de las células madre de la membrana amniótica. Nuevas perspectivas. *Rev Hematol Mex*.2014; 15:11.
110. Terada S, Matsuura K, Enosawa S, Miki M, Hoshika A, Suzuki S, et al. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. *Cell Transplant*.2000; 9(5):701-704.
111. Banas RA, Trumpower C, Bentlejewski C, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol*.2008; 69(6):321-328.
112. Grzywocz Z, Pius-Sadowska E, Klos P, Gryzik M, Wasilewska D, Aleksandrowicz B, et al. Growth factors and their receptors derived from human amniotic cells in vitro. *Folia Histochem Cytobiol*.2014; 52(3):163-170.
113. Parolini O, Souza-Moreira L, O'Valle F, Magatti M, Hernandez-Cortes P, Gonzalez-Rey E, et al. Therapeutic effect of human amniotic membrane-derived cells on experimental arthritis and other inflammatory disorders. *Arthritis Rheumatol*.2014; 66(2):327-339.
114. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J*.1910; 15:307.
115. Nevala-Plagemann C, Lee C, Tolar J. Placenta-based therapies for the treatment of epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*.2015; 17(6):786-795.
116. Gruss JS, Jirsch DW. Human amniotic membrane: a versatile wound dressing. *Can Med Assoc J*.1978; 118(10):1237-1246.
117. Kasi N, Durrani KM, Siddiqui MA. Human amniotic membrane as a versatile biological dressing--a preliminary report. *J Pak Med Assoc*.1987; 37(11):290-292.
118. Burger K. Artificial vaginal reconstruction with the help of amnios. *Zentralblatt Fur Gynakol*.1937:2437-2440.

119. RennekampV H-O, Dohrman P, Fory R, et al. Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model. *Invest Surg.*1997; 7:187-193.
120. Arora M, Jaroudi KA, Hamilton CJ, Dayel F. Controlled comparison of interceed and amniotic membrane graft in the prevention of postoperative adhesions in the rabbit uterine horn model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*1994; 55(3):179-182.
121. Lavery FS. Lime burn of conjunctiva and cornea treated with amnioplastin graf. *Trans Ophthalmol Soc UK.*1946; 66-668.
122. de Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol.*1940; 23:522-525.
123. Singh Dua H, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol.*1999; 83:748-752.
124. Malhotra C, Jain AK. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant.*2014;4(2):111-121.
125. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.*2007; 15(4):459-464.
126. Tauzin H, Rolin G, Viennet C, Saas P, Humbert P, Muret P. A skin substitute based on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.*2014; 15(2):257-265.
127. Forbes J, Fetterolf DE. Dehydrated amniotic membrane allografts for the treatment of chronic wounds: a case series. *J Wound Care.*2012; 21(6):290-296.
128. Singh R, Chouhan US, Purohit S, Gupta P, Kumar P, Kumar A, et al. Radiation processed amniotic membranes in the treatment of non-healing ulcers of different etiologies. *Cell Tissue Bank.*2004; 5(2):129-134.
129. Koob TJ, Rennert R, Zabek N, Masee M, Lim JJ, Temenoff JS, et al. Biological properties of dehydrated human amnion/chorion composite graft: implications for chronic wound healing. *Int Wound J.*2013; 10(5):493-500.
130. Zelen CM. An evaluation of dehydrated human amniotic membrane allografts in patients with DFUs. *J Wound Care.*2013; 22(7):347-8, 350-1.
131. Gibert M, Fauste S. Aplicación de membrana amniótica en el tratamiento de las úlceras crónicas de extremidades inferiores. *Actas Dermo-Sifiliográficas.*2012; 103(7):608.

132. Nevala-Plagemann C, Lee C, Tolar J. Placenta-based therapies for the treatment of epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*.2015; 17(6):786-795.
133. Eskandarlou M, Azimi M, Rabiee S, Seif Rabiee MA. The Healing Effect of Amniotic Membrane in Burn Patients. *World J Plast Surg*.2016; 5(1):39-44.
134. Frykberg R. Diabetic foot ulcers: pathogenesis and management. *Am Fam Physician*.2002; 66(9):1655-1662.
135. Zelen CM. An evaluation of dehydrated human amniotic membrane allografts in patients with DFUs. *J Wound Care*.2013; 22(7):347-8, 350-1.
136. Werber B, Martin E. A prospective study of 20 foot and ankle wounds treated with cryopreserved amniotic membrane and fluid allograft. *J Foot Ankle Surg* 2013 Sep-Oct; 52(5):615-621.
137. Alsina-Gibert M, Pedregosa-Fauste S. Amniotic membrane transplantation in the treatment of chronic lower limb ulcers. *Actas Dermosifiliogr* 2012 Sep; 103(7):608-613.
138. Vivekananda BR, Sachin SS, Gautham JS. Effectiveness of amniotic membrane dressing versus conventional dressing in non-healing lower limb ulcers. *International Journal of Biomedical Research* 2014; 05(05).
139. Joseph WS, Lipsky BA. Medical therapy of diabetic foot infections. *J Am Podiatr Med Assoc* 2010 Sep-Oct; 100(5):395-400.
140. Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol*.2008; 8:43-2180-8-43.
141. Martinez-Gomez Dde A, Ramirez-Almagro C, Campillo-Soto A, Morales-Cuenca G, Pagan-Ortiz J, Aguayo-Albasini JL. Diabetic foot infections. Prevalence and antibiotic sensitivity of the causative microorganisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.2009; 27(6):317-321.
142. Zelen CM, Serena TE, Gould L, Le L, Carter MJ, Keller J, et al. Treatment of chronic diabetic lower extremity ulcers with advanced therapies: a prospective, randomised, controlled, multi-centre comparative study examining clinical efficacy and cost. *Int Wound J*.2016; 13(2):272-282.
143. Warriner L, Spruce P. Managing overgranulation tissue around gastrostomy sites. *Br J Nurs*.2012; 21(5):14-6, 18, 20.
144. Dunford C. Hypergranulation tissue. *J Wound Care* 1999 Nov;8(10):506-507.

145. Hampton S. Understanding overgranulation in tissue viability practice. *Br J Community Nurs* 2007 Sep; 12(9):S24-30.
146. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001 May; 20(4):408-413.
147. Insausti CL, Alcaraz A, Garcia-Vizcaino EM, Mrowiec A, Lopez-Martinez MC, Blanquer M, et al. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen* 2010 Jul-Aug; 18(4):368-377.
148. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014 Oct 1; 3(10):647-661.
149. Roelen DL, van der Mast BJ, in't Anker PS, Kleijburg C, Eikmans M, van Beelen E, et al. Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells. *Hum Immunol* 2009 Jan; 70(1):16-23.
150. Niknejad H, Yazdanpanah G. Opposing effect of amniotic membrane on angiogenesis originating from amniotic epithelial cells. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* 2013; 8(1):39-41.
151. Zheng Y, Ji S, Wu H, Tian S, Zhang Y, Wang L, et al. Topical administration of cryopreserved living micronized amnion accelerates wound healing in diabetic mice by modulating local microenvironment. *Biomaterials* 2017 Jan; 113:56-67.
152. Alcaraz A, Mrowiec A, Insausti CL, Bernabe-Garcia A, Garcia-Vizcaino EM, Lopez-Martinez MC, et al. Amniotic Membrane Modifies the Genetic Program Induced by TGF α s, Stimulating Keratinocyte Proliferation and Migration in Chronic Wounds. *PLoS One* 2015 Aug 18; 10(8):e0135324.
153. Alcaraz A, Mrowiec A, Insausti CL, Garcia-Vizcaino EM, Ruiz-Canada C, Lopez-Martinez MC, et al. Autocrine TGF-beta induces epithelial to mesenchymal transition in human amniotic epithelial cells. *Cell Transplant* 2013; 22(8):1351-1367.
154. Li G, Gustafson-Brown C, Hanks SK, Nason K, Arbeit JM, Pogliano K, et al. c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell* 2003 Jun; 4(6):865-877.
155. Cao P, Eckstein HH, De Rango P, Setacci C, Ricco JB, de Donato G, et al. Chapter II: Diagnostic methods. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011 Dec; 42 Suppl 2:S13-32.

10 ANEXOS

ANEXO I

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA DONACIÓN DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Finalidad y descripción de la donación

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de membrana amniótica, para su uso terapéutico. Es importante que lea esta información, que entienda su contenido y el objeto de la misma y si tiene alguna duda, haga todas las preguntas que crea preciso a su médico. La membrana amniótica es un tejido rico en células con un posible potencial reparador.

El objetivo de la donación es su uso clínico en la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, coordinada por el Dr. José M^a Moraleda Jiménez: -
Reconstrucción de la superficie ocular y la piel en el tratamiento de diferentes patologías. -
Utilización como apósito biológico en el tratamiento de quemaduras, úlceras cutáneas y grandes heridas.

El consentimiento para la donación no supone para usted ningún riesgo o molestia adicional ya que únicamente va a autorizar el uso de la membrana amniótica, que de otra forma se desecharía, para su aplicación clínica. Para su obtención, no se llevará a cabo ninguna prueba o intervención distinta de aquella vinculada con el parto. La donación de la membrana amniótica es voluntaria, por lo que el presente consentimiento puede ser revocado, totalmente

o para determinados fines, en cualquier momento. En caso de revocación ante cualquier uso de la misma, se procederá a su inmediata destrucción, sin perjuicio de la conservación de los datos resultantes del uso que se haya realizado con carácter previo y sin que ello suponga cambio alguno en la relación con su médico ni perjuicio en su tratamiento y/o seguimiento.

Carácter altruista de la donación

La donación y la utilización de la membrana amniótica será gratuita. La donación implica, asimismo, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo. Protección de datos y confidencialidad Los datos personales que se recojan sobre Usted, serán confidenciales. Se asegura la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal del donante, de conformidad a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Persona; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera del indicado, accediendo únicamente a la información obtenida los responsables clínicos.

Sus respuestas al cuestionario y a la entrevista serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Yo, (nombre y apellidos),.....

DECLARO QUE: Entiendo que la membrana amniótica será utilizada con fines terapéuticos.

Entiendo que la membrana amniótica va a ser recogida después del alumbramiento de la placenta, sin perjuicio para mí o mi hijo/a. Entiendo que la identidad de mi persona y mi hijo/a serán tratadas de forma confidencial y codificada, de forma que queden protegidas, de acuerdo a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. Autorizo que se revise mi historia clínica y la de mi hijo/a. Consiento que me extraigan una muestra de sangre para análisis (HIV-SIDA, hepatitis B y C, etc.).

Estas muestras podrán ser almacenadas para futuras determinaciones. Entiendo que cualquier resultado patológico detectado en los estudios realizados con motivo de la donación de membrana amniótica me será comunicado por el médico responsable. Entiendo que mi consentimiento no obliga a recoger ni guardar la membrana amniótica si se considera que las circunstancias no son idóneas. Conservo la posibilidad de renunciar a este consentimiento.

Entiendo que no recibiré compensación económica alguna por la donación. He comprendido la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído convenientes y me han aclarado todas las dudas planteadas, y en consecuencia, doy mi consentimiento para la donación de membrana amniótica.

Firma del Médico que informa:

Firma de la Donante o de familiar en
primer grado (menores de edad)

Fecha:

Fecha:



ANEXO II

Servicio: Cirugía General-Unidad de Heridas

Autorización para:

ETIQUETA IDENTIFICATIVA		
Nº HC:	Nº SS:	
1º Apellido:		
2º Apellido:		
Nombre		
Sexo:	Edad:	Fecha
Nacimiento:		
Dirección:		
Teléfono:		

EL TRATAMIENTO CON MEMBRANA AMNIOTICA EN HERIDAS COMPLEJAS DE PARTES BLANDAS Y PIE DIABÉTICO

DECLARO QUE HE COMPRENDIDO ADECUADAMENTE la información que me ha sido facilitada, y en consecuencia **AUTORIZO** al servicio de Cirugía General – Unidad de Heridas para que se me realice este tratamiento, he aclarado todas mis dudas con la persona responsable Dr. o Dra Estoy satisfecho con la información que se me ha proporcionado y entiendo que este documento puede ser **REVOCADO** por mí en cualquier momento antes de la realización del tratamiento. Para que así conste, firmo el presente documento después de leído.

En Murcia, a

Firma del paciente

Firma de la persona responsable DNI:

Sólo en caso de

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO: Yo, el paciente, con DNI/NIE/Pasaporte:, no doy la autorización para la realización de este tratamiento, o revoco el consentimiento previo si lo hubiere otorgado. Tomo esta decisión habiendo sido informado suficientemente de los riesgos que asumo por este motivo.

En Murcia, a

Firma del Paciente:

COPIA PARA EL HOSPITAL La información sobre el tratamiento que se me va a aplicar: que debo comprender está en la(s) hoja(s) siguiente(s)

ETIQUETA IDENTIFICATIVA		
Nº HC:	Nº SS:	
1º Apellido:		
2º Apellido:		
Nombre		
Sexo:	Edad:	Fecha
Nacimiento:		
Dirección:		
Teléfono:		

Me ha sido entregada la siguiente información por escrito.

En Murcia,

la Firma del paciente: DNI/NIE/Pasaporte:

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ¿EN QUÉ CONSISTE?

La técnica es similar al de una cura tradicional. La diferencia está en el apósito que se pone en la herida, membrana amniótica, que es un tejido procedente de la placenta. Posee células vivas para favorecer la regeneración de la piel en su herida.

FINALIDAD ¿PARA QUÉ SIRVE? Las heridas complejas y úlceras en pie diabético son de curación difícil. El tratamiento actual incluye curas continuas con apósitos y medidas higiénicas, que en ocasiones no bastan para su curación total. En estos casos, el uso de membrana amniótica pretende ayudar a la buena evolución de estas heridas.

CONSECUENCIAS RELEVANTES O DE IMPORTANCIA No se conocen.

RIESGOS DEL PROCEDIMIENTO No se conocen. Puede haber sensación de escozor.

RIESGOS PERSONALIZADOS DE IMPORTANCIA El riesgo de infección en los pacientes con úlceras en pie diabético está siempre presente. No se presentan riesgos adicionales con la aplicación de membrana amniótica que no sean los presentes de la patología del propio paciente.

CONTRAINDICACIONES No debe usarse en personas embarazadas (o que pudieran estarlo) ni si está dando el pecho. La seguridad del tratamiento durante el embarazo y la lactancia no ha sido establecida.

ALTERNATIVAS AL PROCEDIMIENTO La alternativa son las curas habituales que ha llevado hasta ahora. Ello puede implicar en los casos más leves extirpar fragmentos óseos, y en los más graves amputaciones menores o mayores. Siempre existe la opción de asistir a otros centros, cámara hiperbárica en el caso que esté indicado, terapia con láser u otras terapias celulares.



ETIQUETA IDENTIFICATIVA		
Nº HC:	Nº SS:	
1º Apellido:		
2º Apellido:		
Nombre		
Sexo:	Edad:	Fecha
Nacimiento:		
Dirección:		
Teléfono:		

DECLARO QUE HE COMPRENDIDO ADECUADAMENTE la información que me ha sido facilitada, y en consecuencia **AUTORIZO** al servicio de Cirugía General – Unidad de Heridas para que se me realice este tratamiento, he aclarado todas mis dudas con la persona responsable Dr. o Dra Estoy satisfecho con la información que se me ha proporcionado y entiendo que este documento puede ser **REVOCADO** por mí en cualquier momento antes de la realización del tratamiento. Para que así conste, firmo el presente documento después de leído.

En Murcia, a

Firma del paciente

Firma de la persona responsable DNI: DNI:

Sólo en caso de

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO: Yo, el paciente, con DNI/NIE/Pasaporte:, no doy la autorización para la realización de este tratamiento, o revoco el consentimiento previo si lo hubiere otorgado. Tomo esta decisión habiendo sido informado suficientemente de los riesgos que asumo por este motivo.

En Murcia, a

Firma del Paciente:

COPIA PARA EL PACIENTE La información sobre el tratamiento que se me va a aplicar: que debo comprender está en la(s) hojas(s) siguiente(s)

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ¿EN QUÉ CONSISTE?

La técnica es similar al de una cura tradicional. La diferencia está en el apósito que se pone en la herida, membrana amniótica, que es un tejido procedente de la placenta. Posee células vivas para favorecer la regeneración de la piel en su herida.

FINALIDAD ¿PARA QUÉ SIRVE? Las heridas complejas y úlceras en pie diabético son de curación difícil. El tratamiento actual incluye curas continuas con apósitos y medidas higiénicas, que en ocasiones no bastan para su curación total. En estos casos, el uso de membrana amniótica pretende ayudar a la buena evolución de estas heridas.

CONSECUENCIAS RELEVANTES O DE IMPORTANCIA No se conocen.

RIESGOS DEL PROCEDIMIENTO No se conocen. Puede haber sensación de escozor.

RIESGOS PERSONALIZADOS DE IMPORTANCIA El riesgo de infección en los pacientes con úlceras en pie diabético está siempre presente. No se presentan riesgos adicionales con la aplicación de membrana amniótica que no sean los presentes de la patología del propio paciente.

CONTRAINDICACIONES No debe usarse en personas embarazadas (o que pudieran estarlo) ni si está dando el pecho. La seguridad del tratamiento durante el embarazo y la lactancia no ha sido establecida.

ALTERNATIVAS AL PROCEDIMIENTO La alternativa son las curas habituales que ha llevado hasta ahora. Ello puede implicar en los casos más leves extirpar fragmentos óseos, y en los más graves amputaciones menores o mayores. Siempre existe la opción de asistir a otros centros, cámara hiperbárica en el caso que esté indicado, terapia con láser u otras terapias celulares.



AUTORIZACIÓN DE FOTOGRAFIAS

Autorizo y consiento expresamente a que el **Área I de Salud/Murcia-Oeste- Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Arrixaca”** pueda utilizar fotografías o grabaciones de imágenes de las heridas, tomadas por los profesionales del Hospital con el fin de facilitar el seguimiento y evolución visual de la herida o para dar a conocer la trascendencia científica del proceso clínico en actividades de formación o para colaborar en publicaciones científicas. Asimismo, renuncio a pedir cualquier tipo de responsabilidad civil o penal por el mencionado uso de dichas imágenes o grabaciones.

El **Área I de Salud/Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Arrixaca”** se compromete a cuidar de la confidencialidad y secreto de las fotografías o grabaciones, a no cederlas ni venderlas ni permitir el acceso por parte de terceros, salvo en los casos que contempla la ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. Asimismo se le informa de su derecho de acceso, rectificación, cancelación y oposición a/de sus datos, que podrá ejercer en los términos y condiciones previstos en la propia LOPD, solicitándolo a través de la Dirección General del Área I.

Y para que surta plenos efectos, firmo la presente declaración en Murcia a de de

Firmado:

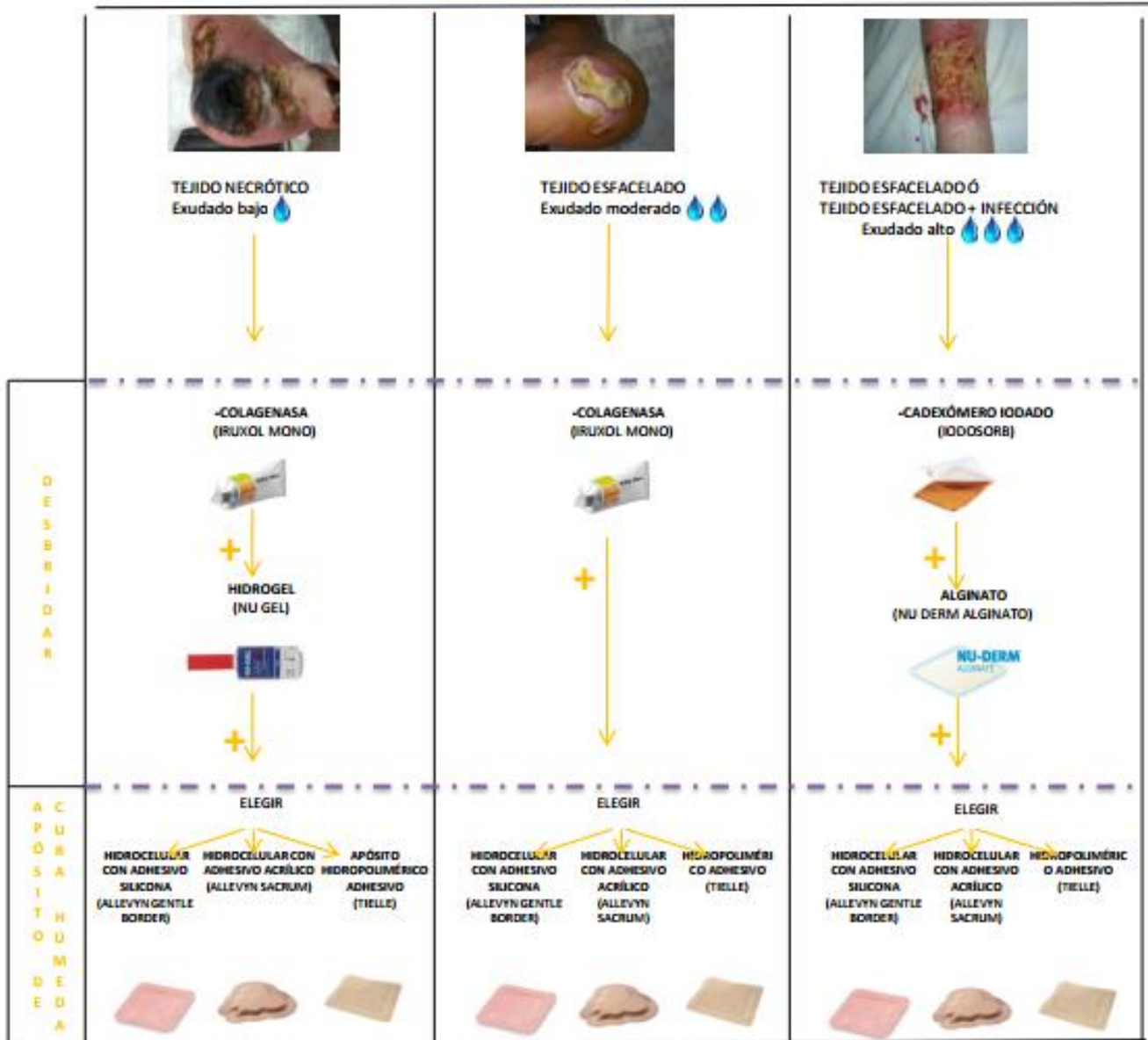
Nombre del Paciente:

DNI:

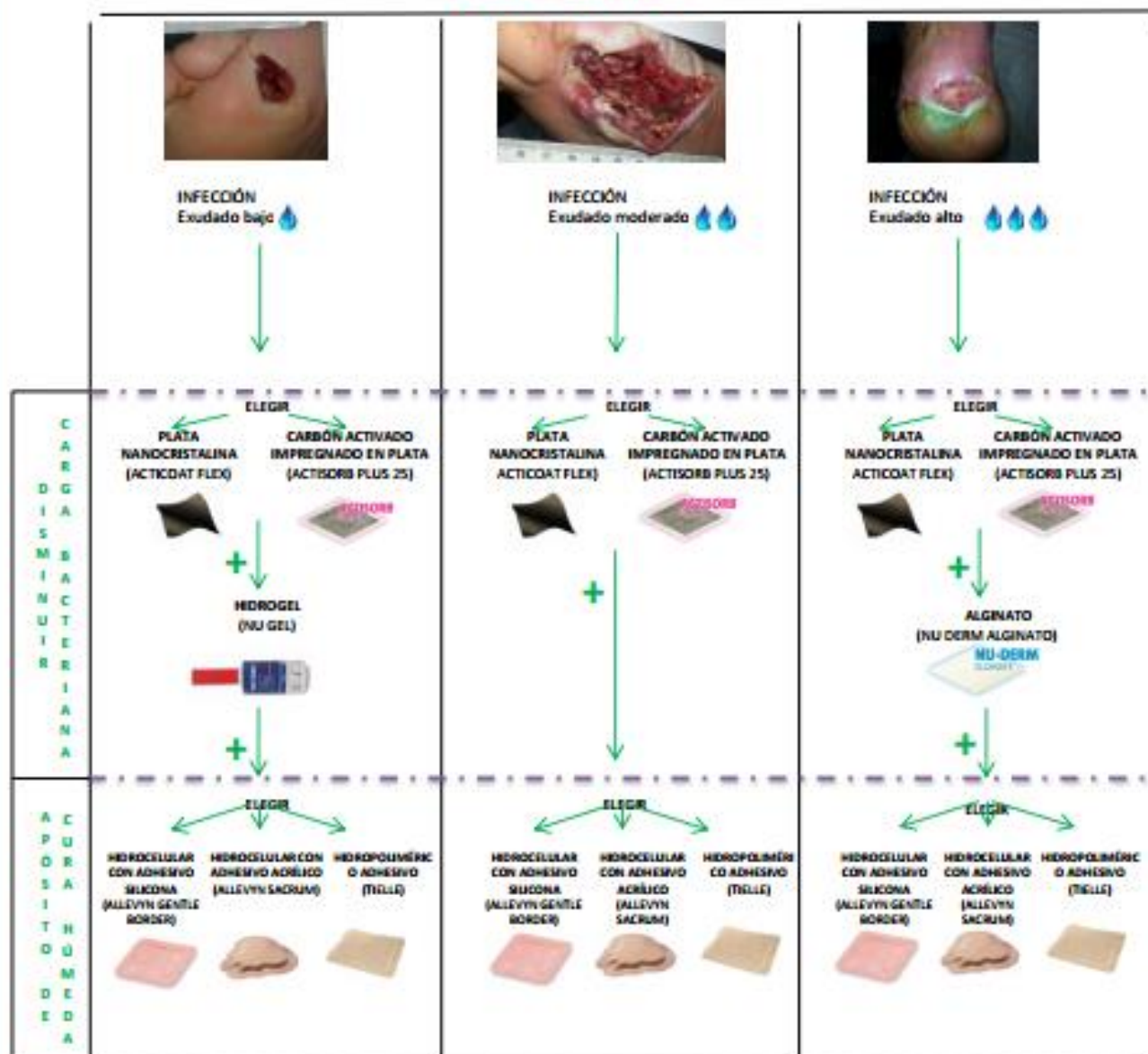
ANEXO III

MANEJO DEL TRATAMIENTO DE LAS HERIDAS

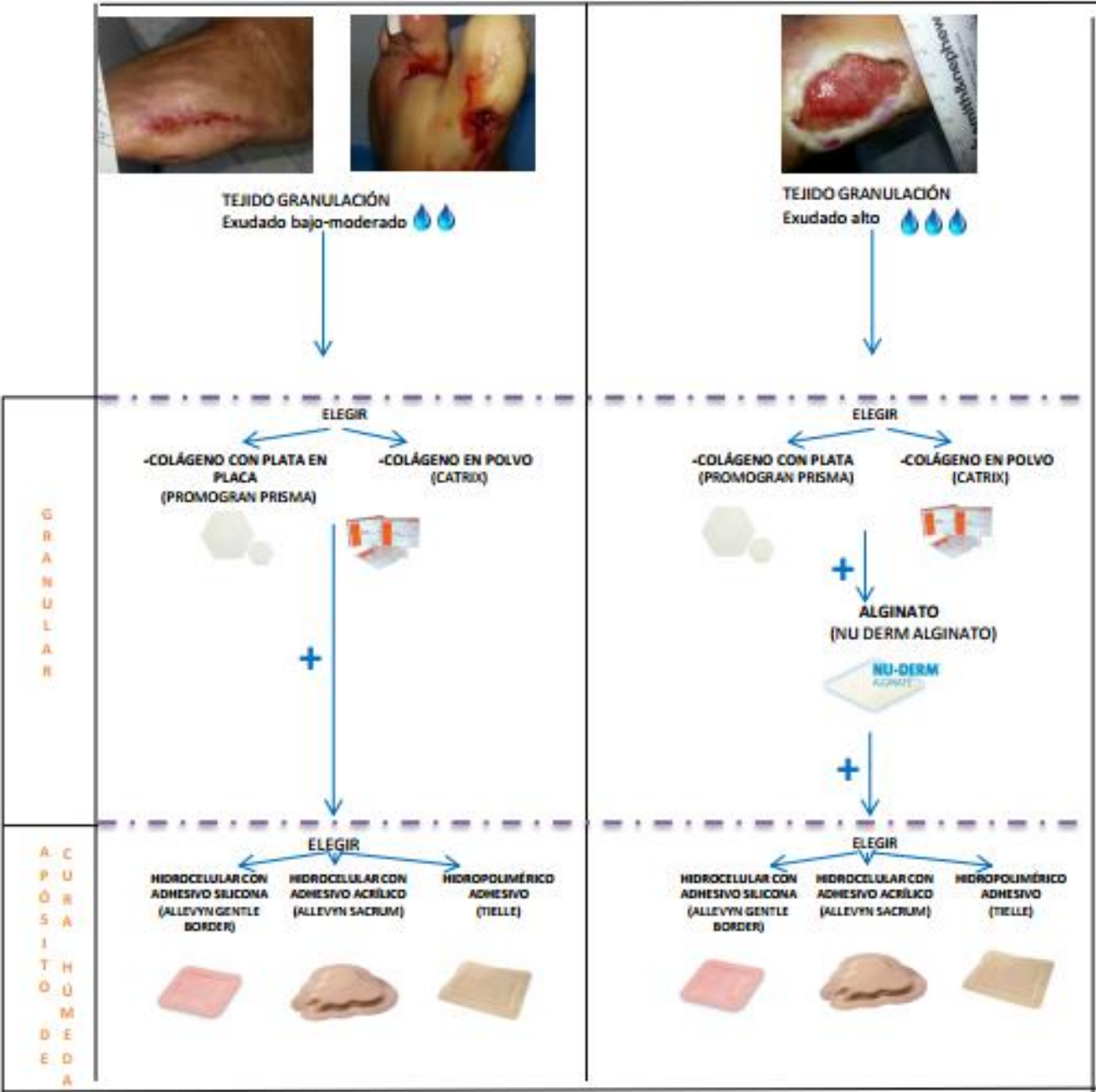
PROTOCOLO T / M (TIME*): Desbridamiento no quirúrgico ± control de humedad CURAS CADA 48 HR



**PROTOCOLO I / M (TIME*): Heridas con infección local ± control de humedad
CURAS CADA 72 HR**



PROTOCOLO E/M (TIME*): Heridas en fase de granulación ± control de humedad
CURAS CADA 72 HR



PROTOCOLO DE TERAPIA PRESIÓN NEGATIVA CURAS 2 VECES A LA SEMANA

