

# Neoangiogénesis y membrana amniótica humana. Estudio clínico-instrumental en la úlcera flebostática de los miembros inferiores

E. G. Rosato - D. Radak - V. Djukic

Institute for Cardiovascular Diseases. Department of Vascular Surgery. University Clinical Center. Belgrado (Yugoslavia)

## RESUMEN

Los fines del presente estudio son los de comprobar si la formación de tejido de granulación obtenido tras medicación con membrana amniótica humana (M.A.H.) corresponde a modificaciones de tipo instrumental, demostrables por medio de fotopletismografías del lecho ulceroso.

Fragmientos de M.A.H. se extendían en la solución de continuidad cada día, ambulatoriamente, en pacientes portadores de *ulcus cruris* abierto de origen postrombótico. Las manifestaciones instrumentales se efectuaban: antes del tratamiento, tras una semana, a las dos semanas y a la completa cicatrización de la úlcera.

En las úlceras con escaso fondo granuloso y fibrinogranuloso, la granulación se obtuvo entre la primera semana de tratamiento. La respuesta con M.A.H. ha resultado negativa en las soluciones de continuidad con fondo de tipo necrótico.

Tras la primera semana de tratamiento en el 84% de las úlceras con escasa granulación y fibrogranulación se registraban modificaciones esfígmicas respecto a los controles basales, como: Aumento de la amplitud y la aparición de dicrotismo. Entre la semana, en todas las soluciones de continuidad se registraban esfigmogramas significativos de regular vascularización del fondo, periodo que coincidía con la fase de la granulación completa de la úlcera.

La M.A.H. de larga conservación estimula la aparición del tejido de granulación de modo significativo en la primera semana de tratamiento. Los aumentos esfígmicos resultan directamente proporcionales a la cantidad de tejido de granulación presente en el fondo de la solución de continuidad.

## SUMMARY

The present study was made in order to determine if granulation tissue development after treatment with Human Amniotic Membrane (HAM) is related with instrumental photoplethysmographically evidenced changes of the «ulcus layer».

## Introducción

La M.A.H. se utilizó por vez primera en las Úlceras Venosas por Hansen, quien afirmó que promueve la cicatrización con tal que permanezca en contacto con la úlcera durante un periodo de seis-diez días (3).

Tal método, no se utilizó mucho, quizá por la dificultad de procurarse la membrana con la condición de ser fresca (2).

Las ventajas del tejido amniótico, como sustituto cutáneo en el tratamiento tópico de las soluciones de continuidad, pueden ser sintetizadas así:

- producción de un tejido sano de granulación, gracias a sustancias todavía no conocidas que estimulan la angiogénesis (7);

- reducción de los tiempos de preparación de un autoinjerto si se compara con los métodos más convencionales (3);

- acción bacteriostática, como se ha demostrado por biopsias del fondo ulceroso, si bien los agentes responsables de tal efecto no han sido identificados (3);

- acción reguladora con mecanismo «feed-back» de la síntesis del protocolágeno por el colágeno producida en el implante (2);

\* Traducido del original en italiano por la Redacción.

Daily, HAM fragments were disposed along the continuity solution of external patients with opened postthrombotic *ulcus cruris*. Instrumental examinations were made before, a week after and two weeks after treatment, and after the complete *ulcus* healing.

*Ulcus* with a slight granulosus or fibrogranulosus layer developed a granulation tissue within the first week of treatment. On the contrary, in continuity solutions with necrotic layer, treatment with HAM failed.

After the first week of treatment, a 84% of *ulcus* with slight granulation and fibrinogranulation, presented some sphygmic variations respect to baseline levels, like: raising in the amplitude and dicrotism appearing. Within the first week, all of the continuity solutions showed significant sphygmograms with a regular vascularization on the layer, this period of time concurred with the complete granulation phase of the *ulcus*.

Long-preserved HAM stimulates in a significant way the appearing of the granulation tissue, within the first week of treatment. Sphygmic raisings are directly proportionals with the amount of granulated tissue evidenced on the layer of the continuity solution.

— función de barrera mecánica, por lo tanto eficacia ante cualquier contaminación ambiental;

— ventaja de ser un tejido biológico que carece de una superficie antigénica, por tanto se halla protegido del fenómeno de rechazo.

Desde 1959, pedazos de M.A.H. de larga conservación en solución isotónica (Amniex) son disponibles aún a distancia del tiempo de obtenerse, superando así todos los problemas derivados del empleo del producto fresco observados en el pasado.

Las características observadas en la preparación de los tejidos por parte de la M.A.H. de larga conservación son superponibles a las observadas con el preparado fresco, como se ha demostrado en estos últimos años por varios investigadores (9, 11, 12, 13).

Nuestro grupo ha demostrado que: si la M.A.H. se asocia a la terapéutica elastocompresiva en el tratamiento de las soluciones de continuidad de origen flebostático, se reduce de modo significativo tanto el tiempo de aparición del tejido de granulación como el tiempo de cicatrización de la *ulcera* (11, 12, 13).

De igual modo se ha demostrado

experimentalmente la eficacia de tal preparado en favorecer el tejido de granulación en las soluciones de continuidad de naturaleza traumática (15).

El propósito de este estudio es comprobar, mediante la fotopletismografía, si a la neoformación de tejido de granulación consecutivo a la aplicación de M.A.H. de larga con-

servación corresponden modificaciones de la onda sifmica, significativo de aumento de la vascularización tópica.

## Pacientes y métodos

Se ha admitido en este estudio pacientes portadores exclusivamente de Insuficiencia Venosa Crónica de los miembros inferiores complicada de *Ulcus cruris* abierta; por contra, se han excluido todos los pacientes que, si bien presentaban úlcera flebostática, sufrían insuficiencia arterial o enfermedad diabética asociada.

En su ficha se relacionaban los siguientes parámetros: edad, sexo, tabaco, previa trombosis venosa del miembro ulcerado, presencia de varices trocales y edema.

En cuanto a la *ulcera*, se anotaban los siguientes parámetros: características del fondo, dimensiones, tiempo de aparición del tejido de granulación y tiempo de cicatrización.

Además, en cada paciente, tras la limpieza del fondo de la *ulcera* y antes del tratamiento con M.A.H. de



Fig. 1 - Revelador Fotoeléctrico sobre el fondo de la úlcera.



Fig. 2 - El fondo de la úlcera es cubierto por más membranas amnióticas humanas en cada medicación.

larga conservación, se efectuaba un examen fotopletismográfico del fondo ulceroso.

Para este estudio se ha utilizado un polígrafo Rheo Preamplifier KREA O.T.E. Biomédica con registrador para fotopletismografía.

El fotoeléctrico estaba en contacto directo con el fondo de la solución de continuidad (Fig. 1).

Los datos esfíngmicos se han obtenido siempre por el mismo operador, así como se ha prestado una particular atención para que la temperatura de la estancia se estandarizara alrededor de 22°C.

Los controles fotopletismográficos se efectuaban: a una semana del tratamiento tópico, a las dos semanas y a la completa cicatrización de la úlcera.

Cada paciente era medicado cada dos días, mediante la aplicación sobre el fondo de la úlcera de fragmentos de M.A.H. de 2 cm<sup>2</sup>, conservada en ampollas que contenían líquido isotónico, y el total, por último, se cubría con gasa estéril (Fig. 2).

A lo anterior se asociaba un vendaje elastocompresivo con venda biextensible, para mantener sólo el ortostatismo tanto dinámico como estático.

El tratamiento con M.A.H. tiene inicio tras un período de «wash-out» tópico de al menos setenta y dos horas.

## Resultados

De septiembre 1989 - septiembre 1990 se han seleccionado y tratado ambulatoriamente de Insuficiencia Venosa Crónica en el tercer estadio con Ulcus cruris abierto 23 pacientes, 19 mujeres y 4 hombres.

La edad máxima de los pacientes fue de 78 años y la mínima de 28, con edad media de 59 años. Sólo uno era fumador.

Todos los pacientes, en la anamnesis, referían haber sido ingreados en un hospital por trombosis venosa profunda del miembro afecto de

úlcera. Las varicosidades, de tipo troncular, se hallaban presentes en el 69,5% del grupo y el edema en el 83%.

El examen clínico del fondo ulceroso demostraba: un 26% escasamente granuloso (Tipo I), un 57% fibrino-escasamente granuloso (Tipo II) y un 17% fibrino-necrótico (Tipo III).

El examen plánimétrico de la úlcera resultaba: de pocas dimensiones (<2 cm<sup>2</sup>) en el 26,5%, de medias dimensiones (2-5 cm<sup>2</sup>) en el 49%, de grandes dimensiones (>5 cm<sup>2</sup>) en el 26,5%.

La localización de la úlcera era: dorso del pie 13%, supramaleolar interna 80%, perimaleolar externa 17%.

El examen fotopletismográfico ba-

sal registraba una asfíxia siempre presente en el fondo en el fondo ulceroso del Tipo III, el del Tipo I era en el 66,6% hiposfígmico y en el 33% normosfígmico y, por último, en el Tipo II el 77% hiposfígmico y el 23% normosfígmico.

La aparición del tejido de granulación se ha obtenido en una semana para las úlceras de los Tipos I y II, en tanto que para las de Tipo III el fondo permanecía inmutable respecto al basal.

Tras la primera semana de tratamiento, en 16 pacientes (84%) el examen del registro fotopletismográfico en las úlceras con fondo Tipo I y Tipo II demostraba un aumento de la amplitud y de la aparición del dicrotismo de la onda respecto al basal (Tabla I y Fig. 3).

Tabla I

### Esfígmograma del fondo de la úlcera, antes, durante y después del tratamiento con membrana amniótica (Amniex)

Caso	Fondo (tipo)	Basal	7 días	14 días	Curación
1	II	Normal	Normal	Normal	Normal
2	II	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
3	I	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
4	I	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
5	II	Hiposfígmia	Hiposfígmia	Normal	Normal
6	I	Hiposfígmia	Hiposfígmia	Normal	Normal
7	I	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
8	I	Hiposfígmia	Hiposfígmia	Normal	Normal
10	III	Asfíxia	/	/	/
11	II	Hiposfígmia	Hiposfígmia	Normal	Normal
12	III	Asfíxia	/	/	/
13	III	Asfíxia	/	/	/
14	II	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
15	III	Asfíxia	/	/	/
16	II	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
17	I	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
18	II	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
19	II	Normal	Normal	Normal	Normal
20	II	Normal	Normal	Normal	Normal
21	II	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
22	II	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal
23	II	Hiposfígmia	Normal	Normal	Normal



Fig. 3 - Fotopletismografía efectuada: antes, durante y tras el tratamiento con membrana amniótica humana (Amniex).

respecto a los obtenidos antes del tratamiento en las soluciones de continuidad. Además, junto a las modificaciones vasculares, hay que señalar las referentes a la reducción de los elementos polimorfonucleares del tejido conectivo (7, 10).

**Page Faulk** piensa que tales efectos pueden ser debidos a un factor angiogénico amniótico, agente de tipo endotelio-capilar, todavía no aislado por completo.

Además, según recientes estudios clínicos, el mejor trofismo del tejido neiformado, tras la aplicación de la M.A.H., podría ser debido al aumentado aporte de precursores de la sustancia fundamental del conectivo por parte de los glucosaminoglicanos y del colágeno contenido en

De la fase de granulación a la de cicatrización, sucedidas en diferentes tiempos, según las dimensiones de la úlcera, los esfígmogramas han resultado sin variación en el 89% de los pacientes tratados, mientras en 2 pacientes, el 11%, se ha registrado un aumento de la amplitud de la onda a la epitelización de la úlcera respecto a la fase de completa granulación (Tabla 2).

En cuanto se refiere a los tiempos de cicatrización, ver la Tabla 3.

En ningún paciente se ha asociado terapia antibiótica y, además, el componente álgido local ha desaparecido medianamente tras tres días de la aplicación de la M.A.H.

## Discusión

Según algunos estudios efectuados sobre muestras de biopsia en el hombre, desde el punto de vista histológico, la M.A.H. determinaría cambios significativos referentes a la pared de los vasos que se tornan delgados, permeables y numerosos

Tabla 2  
Amplitud de la onda esfígmica en mm, antes, durante y después del tratamiento con membrana amniótica humana (Amniex)

Caso	Fondo (tipo)	Basal (mm)	7º día (mm)	14º día (mm)	Epitelización (mm)
1	II	7	10	15	15
2	II	4	4	12	12
3	I	4	7	13	13
4	I	8	12	12	12
5	II	2	7	7	7
6	I	3	17	17	17
7	II	2	4	4	4
8	I	5	5	13	13
9	II	4	10	17	19
10	II	3	5	6	8
11	II	5	7	15	15
12	II	4	4	10	10
13	I	5	7	7	7
14	II	4	8	8	8
15	II	18	35	35	35
16	II	8	24	24	24
17	II	3	10	10	10
18	II	4	8	12	12
19	II	4	6	12	12

**Tabla 3**  
**Tiempo de cicatrización**

Dimensiones	Días
Pequeñas	Mín.
	Máx.
	Media
Media	Mín.
	Máx.
	Media
Grandes	Mín.
	Máx.
	Media

la membrana amniótica. Pero todo esto queda por confirmar (8, 13, 15).

Estudios ultraestructurales sobre la M.A.H. de larga conservación demuestran la presencia de proteohepar-sulfatos más abundantes sobre la vertiente estromal, y estos últimos son resultados análogos a los vistos con el preparado fresco (8).

A partir de la segunda-tercera aplicación, sobre el fondo de la úlcera comienzan a aparecer manchas ro-



Fig. 4 - Tejido de granulación madura tras medicación tópica sobre el fondo de la úlcera con membrana amniótica humana.

jas o de color rosáceo de límites no bien definidos formados por el grupo y trenzado de filamentos de color rosado. Dichas formaciones son el aspecto inicial visible del tejido de granulación estimulado por la membrana amniótica.

Las áreas de neogranulación tienden de modo regular a aumentar de número y de dimensiones y a confluir hasta que toda la superficie de la herida asume una coloración uniforme, constituyendo así el tejido de granulación maduro (Fig. 4).

La fotopletismografía nos ha permitido distinguir, basados en la actividad estigmática del fondo, tres tipos distintos de úlceras flebostáticas: las hiposfígmicas, las normosfígmicas y las asfígmicas. Las hiposfígmicas prevalecen sobre todo el grupo y podrían ser la expresión del grado extremo de anoxia-necrosis instaurada a causa de la estasis crónica, de acuerdo con las dos siguientes hipótesis etiopatogénicas. Según la primera, la ulceración está provocada por los efectos de la estasis venosa



Fig. 5 - A: Fondo ulceroso de Tipo II antes del tratamiento. B: Intensa granulación del lecho ulceroso tras tratamiento tópico con membrana amniótica humana. C: Cicatrización de la úlcera flebostática, localizada en el cuello del pie tras terapia con trozos de membrana amniótica humana de larga conservación.



A)



C)

crónica transmitida al interior del microcírculo cutáneo (capilaro-venular). Por contra, la segunda hipótesis se refiere a la formación de una barrera intersticial difusa a nivel microcirculatorio, provocada por el aumento de la permeabilidad capilar, de la subsiguiente formación de asas pericapilares de fibrina que, por la reducida actividad fibrinolítica local, formaría una barrera pericapilar comprometiendo en gran medida el metabolismo local con drástica reducción del oxígeno cutáneo (3).

El otro grupo de úlceras, las de fondo normosfígmico, a pesar de la pérdida de tejido cutáneo, característica «paradoja», podría hallar su explicación sobre otra teoría etiopatogénica de la úlcera flebostática. Tal teoría postula la existencia de «shunts» arterio-venosos cutáneos provocados por la persistente alta presión venosa, «shunts» que serían responsables de la sustracción de sangre oxigenada de la piel superpuesta, determinando así la isquemia y ulceración (3).

El hallazgo de asfemia, típica de úlcera del Tipo III, es debido a la acumulación de materiales necróticos en el fondo, que se interponen como una barrera al fotoeléctrico determinando así un cuadro de silencio esfígmico. Tales úlceras, tras la «toilette» quirúrgica, resultan hiposfígmicas.

La variabilidad de los cuadros esfígmicos observada en el presente estudio resulta estar de acuerdo con los datos relativos a una precedente investigación nuestra sobre los índices de perfusión loco-regional, valorada con técnica de la presión parcial transcutánea de oxígeno ( $TcPO_2$ ) en miembros inferiores afectos de úlceras de origen venoso (4).

Efectivamente, con tal método en el 55,5% de los casos las úlceras eran hipoxicas de modo grave, con valores por debajo de 40 mmHg, en el 18% inferiores a 50 mmHg, mientras en el resto de los casos presen-

taban valores superiores a los 50 mmHg.

Desde el punto de vista instrumental, existe una relación de casi directa proporcionalidad entre tratamiento tópico con M.A.H. y aumento de la amplitud de la onda esfígmica sólo en la fase de granulación; por contra, en el 94% de las úlceras no existe influencia alguna de la M.A.H. de la fase de granulación a la fase de epitelización, si no la de formar una barrera mecánica de protección al tejido de granulación.

¿Cómo explicar todo esto?

El acúmulo de tejido de granulación dura cerca de dos semanas; se asiste en seguida a una disminución de la cantidad total de tejido de granulación presente en el área de la herida debido este último fenómeno a la disminuida vascularización del estrato subcutáneo epitelial, concomitante con la maduración del colágeno y no al engrosamiento de la epidermis supraestante (6).

La membrana amniótica, como sustituto cutáneo, explicaría los efectos supracitados sólo si la flebostasis sea correcta de modo temporal.

En efecto, hasta los inicios del siglo, la membrana amniótica humana se empleó con óptimos resultados en la preparación de autoinjertos cutáneos en los quemados, en tanto su aplicación en la reparación de las úlceras flebostáticas, aunque daba buenos resultados durante las curas en el hospital, las recidivas a distancia superaban el 50%. Tal fracaso era debido, probablemente, a la no asociación de la terapia elástocompresiva.

Un estudio prospectivo nuestro ha demostrado cómo la terapia elástocompresiva tras la cicatrización de las soluciones de continuidad, obtenida con trozos de membrana amniótica, es capaz de mantener el resultado a distancia con una incidencia de recidivas del 7% a los tres años de la cicatrización (12).

El presente estudio efectuado con

el fin de documentar por medio de un método simple e incruento, tal la fotopletismografía, aunque cualitativamente, de modo gráfico el aumento vascular del lecho ulceroso tras tratamiento con M.A.H. de larga conservación.

El estímulo precoz sobre la neoangiogénesis, la calidad del tejido de granulación, la reducción del tiempo de granulación y del tiempo de epitelización, aparte del mejor trofismo del tejido cicatrizal, la reducción del componente álgido local, son las características óptimas de una medicación; si, además, tal medicación es un tejido biológico, sobre todo especie-específico, cual la membrana amniótica humana, la medicación, entonces, es ideal.

## BIBLIOGRAFIA

- ARKLE, C. A.; ADINOLFI, M.; WELSH; et al.: Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. «Lancet», 2: 1003, 1981.
- BENNETT, J. P.; MATTHEWS, PAGE FAULK, W.: Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion. «Lancet», 1153-1155, 1980.
- BROWSE, N. L.; BURNARD, K. G.; THOMAS, M. L.: «Diseases of the veins-Pathology, diagnosis and treatment». Edward Arnold. London, 1988.
- CHIARENZA, S.; ROSATO, E. G.; HOHN, L.; et al.: Le ulcere flebostatiche: studio polidiagnóstico. «Flebología 88». Moduzzi Editores. Bologna, 1988, 461-468.
- DINO, B. R.; EUFEMIO, M. S.; DE VILLA: The establishment of an amniotic bank and its practical application in surgery. «J. Philippine Med. Assoc.», 42: 357-366, 1966.
- DONATI, L.; GRISOTTI, A.; ROSSI, R.: «La cicatrizzazione-aspetti biologici e clinici». Edizione Minerva Medica. Torino, 1972.
- EGAN, T. J.; O'DRISCOLL, J.; THAKAR, D. R.: Human amnion in the management of chronic ulceration of the lower limb: a clinicopathologic study. «Angiology», 1983, 197-203.

8. GUZZARDI, S.; GOVONI, P.; RUGGERI, A.: Indagine istologica ed ultrastrutturale su membrana amniótica fresca ed a lunga conservazione. «Biomateriali», 1/2: 19-29, 1989.
9. ORECCHIA, G.; DONADINI, A.; CICCOMASCOLO, F.: Trattamento delle ulcere degli arti inferiori con amnios. «Ann. Int. Derm. Clin. Sper.», 38: 303-307, 1984.
10. PAGE FAUL, W.; MATTHEWS, R.; STEVENS, P. J.; et. al.: Human amnios as an adjunct in wound healing. «Lancet», 1156-1157, 1980.
11. ROSATO, E. G.; CHIARENZA, S.; GRASSO, A.; et. al.: Impiego della membrana amniótica humana (Amniex) e di estratti placentari titolati (Placentex) nel trattamento dell'ulcera flebostatica degli arti inferiori. Follow-up ad un anno. «Flebologia». Monduzzi Editore. Bologna, 1987, 903-910.
12. ROSATO, E. G.; RADAQ, D.; CHIARENZA, S.; et. al.: Trattamento chirurgico e trattamento conservativo dell'ulcera flebostatica degli arti inferiori. Risultati a distanza. «Flebologia». Monduzzi Editores. Bologna, 711-716, 1988.
13. ROSATO, E. G.; RADAQ, D.; DJUKIC, V.; et. al.: Impiego della membrana amniótica (Amniex) e del polidesossiribonucleotide (PDRN) di derivazione placentare (Placentex) nella riparazione dei tessuti periferici di origine flebostatica. «Flebologia». Monduzzi Editores. Bologna, 275-279, 1989.
14. TRELFFORD, J. D.; TRELFFORD-SAUDER, M.: The amnion in surgery, past and present. «Am. J. Obstet. Gynecol.», 134: 833, 1979.
15. VIGANO, M.; KLINGER, M.; BLANDINI, D.; et. al.: Valutazioni sperimentali in tema di riparazione tessutale sull'uso di polidesossiribonucleotide (PDRN) placentare (Placentex) e di membrana amniótica (Amniex). «Atti 38 Cong. Soc. Ital. Chir. Plastica». Monduzzi Editore. Bologna, 1347-1354, 1989.