



*Terapia combinada de Concentrados de Factores
de Crecimiento Autólogos (CGF) y
Ozonoterapia: Su aplicación pie diabético
neuroinfeccioso*

Dra. Adriana Schwartz

**Encuentro Internacional de la 2ª Edición de la Declaración
de Madrid**

12 Junio 2015

REAL ACADEMIA DE MEDICINA

Estadísticas Diabetes Mellitus

- ◉ Se predice que para el 2025 habrán unos 500 millones de personas con diabetes si no se toman medidas (Mbanya JC, 2011).
- ◉ La incidencia de enfermedades cardiacas e infarto es de 2 a 4 veces más alta en diabéticos.
- ◉ El 15% de los diabéticos desarrollan una úlcera al menos una vez en su vida. (Reiber, 1996).
- ◉ Un 20% llega a la amputación independientemente del tipo de úlcera que presenten.
- ◉ El 70% de las amputaciones ocurren en pacientes diabéticos.
- ◉ Cada 30 segundos un paciente diabético es amputado
- ◉ La expectativa de vida es de 10 a 15 veces menor, en un individuo diabético con respecto a uno no diabético.

¿Cuánto cuesta tratar una úlcera de pie diabético en el mundo desarrollado?

- ◉ En el 2002 el costo médico por tratar pacientes con DM fue de 92 billones USD
- ◉ La pérdida de productividad representó un adicional de 40 billones
- ◉ Para el 2010 las proyecciones fueron aproximadamente de 160 billones
- ◉ Para el 2020 las previsiones son de 200 billones de dólares, o incluso mayores

(Hogan P et al, 2003).



“HAY EVIDENCIAS, CLÍNICAS Y EXPERIMENTALES, CONVINCENTES DE QUE LA GENERACIÓN DE ERO ESTÁ INCREMENTADA EN AMBOS TIPOS DE DIABETES Y QUE EL DESENLACE DE LA DIABETES ESTÁ ESTRECHAMENTE ASOCIADO AL ESTRÉS OXIDATIVO”



“Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot”

Gregorio Martinez-Sanchez a, Saied M. Al-Dalain a, Silvia Menendez b, Lamberto Re c,
Attilia Giuliani ct, Eduardo Candelario -Jalil a, Hector Alvarez e,

Jose Ignacio Fernandez-Montequin e, Olga Sonia Leon a,* European Journal of Pharmacology 523 (2005) 151- 161

American Diabetes Association and the German Diabetes Society. 2001.

O3 EN LA DIABETES

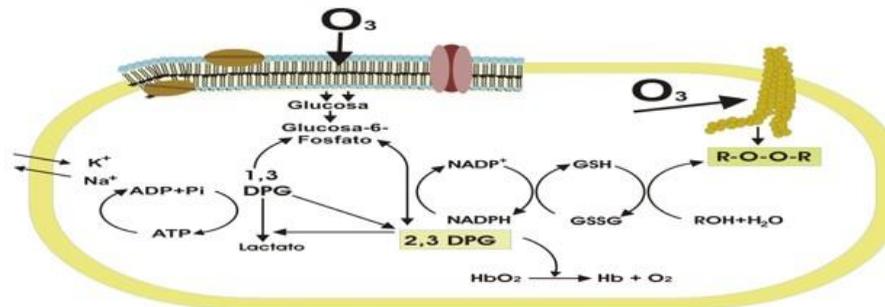
- ◉ Bajas dosis de ozono puede inducir una reorganización de las vías bioquímicas, la activación del segundos mensajeros, que origina variados efectos biológicos.
- ◉ La respuesta es dependiente de la activación del mecanismo de transducción nuclear (Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) y de la síntesis de proteínas como la SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), HO1 (heme oxygenase 1), etc.) utilizando bajas dosis de ozono.
- ◉ Estimula la producción del Oxido Nítrico a partir del aminoácido de la vía de la L-arginina por la acción de la enzima Oxido Nítrico Sintetasa y que con algunos Co-factores como flavín mononucleótido, flavín adenina dinucleótido, la tetrahidrobiodipterina y NADPH van a producir Oxido Nítrico y L-citrulina como producto de desecho.
- ◉ En consecuencia, un paciente con isquemia crónica que se someta a ozonoterapia, puede mejorar clínicamente gracias a la formación de sucesivas cohortes de eritrocitos cada vez más capaces de aportar oxígeno a sus tejidos isquémicos.

Leon et al., *Mediat Inflamm* 1998; 7:289-94. Re et al., *Arch Med Res* 2008; 39:17-26

Viviana, C. & Gabriele, T. Exposure to low ozone concentrations induces cytoskeletal reorganization, mitochondrial activity and nuclear transcription in epithelial human cells. in *Europena Cooperation of Medical Ozone Societies Congress* (Zurich, 2014).

Efectos Terapéuticos del Ozono en el pie diabético

- ◉ La PO₂ arterial aumenta y la venosa disminuye mejorando la oxigenación celular en los tejidos isquémicos, lo que ocasiona un cambio en el metabolismo celular-por activación de los procesos aeróbicos (glicolisis, ciclo de Krebs, β-oxidation de los ácidos grasos) y de los recursos energéticos.
- ◉ Hay un aumento de la 2.3 DPG (Diphospho glicerol), que facilita la transferencia de oxígeno atrapado por la HbO₂ y lo cede a los tejidos mejorando ostensiblemente la microcirculación.
- ◉ Efecto germicida, bactericida y fungicida debido a su alto poder oxidante por una discreta formación de peróxidos.



1999: Studies on the biological effects of ozone: Release of factors from ozonated human platelets G. Valacchi and Velio Bocci CA Institute of General Physiology, University of Siena, 53100 Siena Italy.

Factores que influyen en la perpetuación de la úlcera en un diabético

- ◉ El pool local de Factores de Crecimiento (GFs) y sus correspondientes receptores disminuyen y deterioran en el paciente diabético debido a que la expresión de transcripción celular de las células implicadas en el lecho de la úlcera, se encuentra reducida y/o que la degradación enzimática está aumentada. *(Clark, 2008)*
- ◉ La perpetuación de neutrófilos, macrófagos, proteasas y citocinas pro-inflamatorias en la úlcera del DF, contribuye al nacimiento y perpetuación de un micro-ambiente de degradación que resulta del desequilibrio entre la síntesis y degradación de la matrix celular. *(Berlanga et al., 2008)*
- ◉ Debido a los altos niveles de glucosa y otras sustancias metabólicas que son tóxicas para el endotelio y células fibroblásticas éstas se ven frenadas o senescentes.
- ◉ En este medio el tejido de granulación lanza un programa de apoptosis que eventualmente oculta el proceso de granulación. *(Goren et al., 2006)*



FACTORES DE CRECIMIENTO EN ULCERA

- ◉ Todo ello contribuye a un anormal y tórpido proceso de cicatrización.
- ◉ Esto es una evidencia del importante rol que juegan estas sustancias en el proceso de reparación tisular.
- ◉ La sola observación de que el lecho de las úlceras diabéticas son ricas en proteasas inflamatorias y que éstas frenan la liberación de GFs, justifica ampliamente la utilización de PRPO3 en ellas. (*Burrow et al., 2007*)

Sampson, S., Gerhardt, M. & Mandelbaum, B. (2008). Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*1, 165-74.

Lee, K. S., Wilson, J. J., Rabago, D. P., Baer, G. S., Jacobson, J. A. & Borrero, C. G. (2011). Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future? *AJR Am J Roentgenol*196, 628-36.

Pacifici, L., Casella, F. & Maggiore, C. (2002). [Platelet rich plasma (PRP): potentialities and techniques of extraction]. *Minerva Stomatol*51, 341-50.

Gao, F., Wang, J. X. & Han, Y. (2009). [Research Advance on Application of Platelet-rich Plasma in Wound Repair-Review.]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*17, 840-3.

Cieslik-Bielecka, A., Bielecki, T., Gazdzik, T. S., Arendt, J., Krol, W. & Szczepanski, T. (2009). Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury. *Transfus Apher Sci.*

FUNDAMENTOS

- ◉ Hay estudios que evidencian que los factores de crecimiento y citocinas presentes en las plaquetas tienen efectos anti-inflamatorios, inhiben el sangrado post-operatorio, inducen la osteogénesis, reparación de heridas, reparación de tejidos blandos y músculos. Adicionalmente liberan proteínas con efectos quimiotácticos para macrófagos, células mesenquimales y osteoblastos que no solo promueven la renovación de tejido necrótico o dañado sino que estimulan su regeneración.
- ◉ Además, Los leucotrienos A4 (LXA4) al estar aumentados en el PRP, sugieren que el PRP puede suprimir la liberación de citoquinas, limitar la inflamación, y, de ese modo, promover regeneración de los tejidos.
- ◉ 2011: Schwartz, A. Martínez- Sánchez, G. Re, L. Growth Factors and its application in regenerative medicine. Potencial use of ozone as activator of growth factors. Spanish Journal of Ozonotherapy (REOZ). Vol.1, nº 1, pp. 54-73.
- ◉ 2010 L. RE, G. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. PEREZ-DAVISON, M. SIRITO. Role of Ozone/Oxygen in Fibroblast Growth Factor Activation. Discovering the Facts. *International Journal of Ozone Therapy* 9: 55-58

Mecanismo de acción de la ozonización del plasma

- ◉ Al ozonizar el PRP se forman ozónidos y otros derivados peróxidos, que difunden en el interior de la plaqueta activando la Fosfolipasa C y la A2, facilitando la formación de sustancias pro-agregantes (PGE2, Tromboxano, etc) que acelera el lisado de las plaquetas.
- ◉ Estimula la liberación de algunos factores de crecimiento, como el PDFG, TGF-b1, IL-8 y TBX2
- ◉ El O3 eleva la concentración de FGF 600 % después que se incubaba con las plaquetas.



Schwartz, A. Martínez- Sánchez, G. Re, L. (2011). Growth factors derived from platelet and its applications in regenerative medicine. Potential use of ozone as activator. *Revista Española de Ozonoterapia* . Vol.1, nº 1, pp. 54-73.

Objetivo del estudio

- ◉ Investigar la eficacia terapéutica de la combinación de los Factores de Crecimiento y el Ozono en el tratamiento de la úlcera del pie diabético neuro-infeccioso.
- ◉ Asegurar el fondo de la úlcera con tejido de granulación en breve tiempo.
- ◉ Contener y detener la infección
- ◉ Mantener la zona periulcerosa seca sin signos irritativos.
- ◉ Mejorar la microcirculación sanguínea
- ◉ Controlar los parámetros bioquímicos (glucosa, Hb glicosilada, colesterol etc.)

Todo ello son cualidades que ofrece la ozonoterapia sistémica, en bota y la aplicación de CGF.



TIPO DE ESTUDIO

- ◉ Se realizó un estudio prospectivo, mono-céntrico, aleatorizado en el que participaron $n^{\circ}= 30$ pacientes que se dividieron en dos grupos.
- ◉ Primer grupo $n^{\circ}=20$ tratados con ozono sistémico y local + factores de crecimiento.
- ◉ Segundo grupo $n^{\circ}=10$ pacientes tratados con antibióticos, curas tópicas con suero fisiológico, antisépticos o intervenciones quirúrgicas locales sin el empleo de CGF ni Ozono.
- ◉ El intervalo de edades fue 45 a 62 años con pie diabético y afectación grados II y III según la clasificación de Wagner durante los meses de junio a diciembre del 2012 (6 meses)
- ◉ Todos ellos fueron atendidos de forma ambulatoria previo consentimiento informado escrito.
- ◉ Todos llevaron la medicación habitual para el control de la diabetes como tb la dieta apropiada.
- ◉



ESTUDIO

- ◉ Se tomaron cultivos seriados durante todo el tratamiento (cada 15 días).
- ◉ Se controlaron los parámetros de glicemia sérica, colesterol y hemograma.
- ◉ Se tomaron fotografías seriadas de las lesiones anotando sus características e incluyendo un sistema de referencia que permitiera su exacta cuantificación en posteriores estudios.
- ◉ Se compararon los tiempos empleados en tratamientos previos con mal resultado frente al tratamiento con PRPO3.
- ◉ En todos los casos que entraron al estudio se encontraron fenómenos reparativos enlentecidos durante periodos muy largos, de hasta 23 años de evolución sin solución aparente alguna y parámetros bioquímicos muy inestables.



PROTOCOLO OZONO SISTÉMICO: 20 SESIONES AUTOHEMOTERAPIA MAYOR. 2 VECES X SEMANA Y RECTOCLISIS 3 V/SEMANA

Semana de tratamiento	Concentración O ₃ (µg/mL)	Volumen O ₃ (mL)	Dosis (mg)
Primera	15	100	1.5
Segunda	20	100	2.0
Tercera	30	100	3.0
Cuarta	35	120	4.2
Quinta	40	120	4.8



MANEJO DE LA ÚLCERA

Curas diarias:

- ◉ Lavado de la lesión con agua ozonizada a concentración a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- ◉ Ozonización en bota a (80, 60, 50, y 30) $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 20 min. Aplicaciones diarias.
- ◉ Aplicación de aceite ozonizado Oleosan a 800, 600 y 400 IP.
- ◉ Una vez que aparecido el tejido de granulación, se bajaron las concentraciones a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y espaciaron las sesiones a días alternos de ozono en bota.
- ◉ Una vez conseguida la asepsia, corroborada mediante cultivo, y establecida la presencia de granulación, se comenzó con la aplicación de CGF y PRPO3 cada 10 días, hasta conseguir la cicatrización completa de la lesión.
- ◉ En todas las heridas se aplicaron apósitos de Oxioderm y Senitul que se mantuvieron durante 3-5 días.





APÓSITOS SENITUL, OXIODERM Y FLUVIX (LAB. HEBERFARMA)

El Factor de Crecimiento Epidérmico de Heberfarma es una formulación del factor de crecimiento epidérmico y del queratinocito humano recombinante (hrEGF) para administración lesional. Se obtiene por tecnología del ADN recombinante, al insertar el gen humano del EGF en *Saccharomyces cerevisiae*.

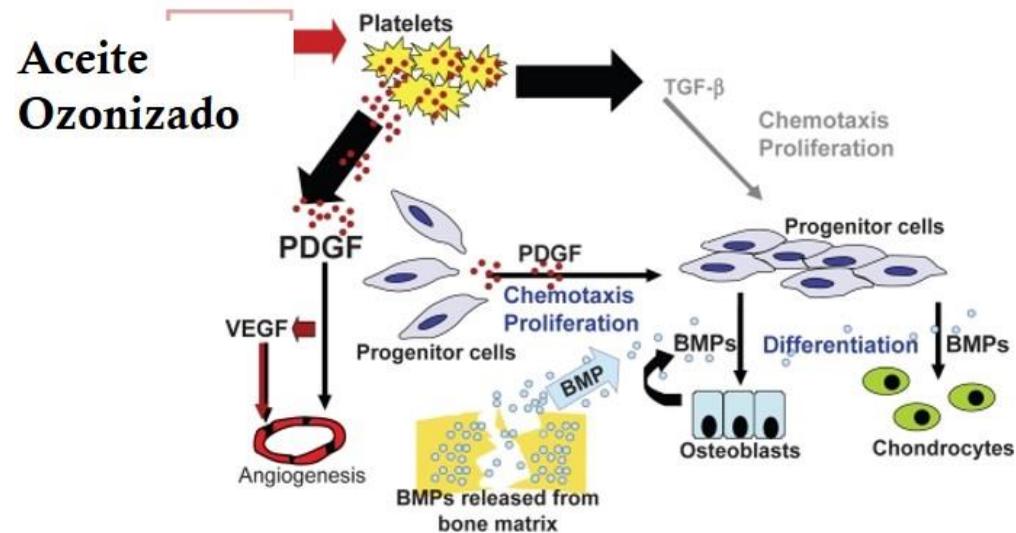




Aceites Ozonizados. Mecanismo

Liberación de factores de crecimiento: Diversos componentes de los aceites ozonizados pueden liberar factores de crecimiento como PDGF, TGF- β y VEGF que pueden incidir en la remodelación tisular.

Oxidación directa sobre los microorganismos.



G. Valacchi, Y. Lim, G. Belmonte et al., "Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 19, no. 1, pp. 107–115, 2011.

Hee et al. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 368-74

MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL CGF, APLICACIÓN EN ÚLCERA DE PIE DIABÉTICO

Se utilizó sistema de centrifugación diferenciada, que mediante diferentes velocidades de centrifugación que nos permitió:

- ◉ separar los componentes y
- ◉ aislar las células CD34+hematopoyéticas
- ◉ Se usaron concentraciones de 2,5 - 3 sobre la concentración basal

La concentración óptima para estimular fibroblastos es 2,5
Concentraciones superiores pueden tener efectos
inhibitorios

Para la preparación del Plasma Gel se utilizó el Activador de Plasma Gel (APAG)

- ◉ Graziani et al. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblast and fibroblast. Clin oral 2004 Implants Res. 2006 Apr;17(2):2012-9
- ◉ Weibrich G. "Effect of platelet concentration in platelet rich plasma on peri-implant bone regeneration. Bone 34:665-671

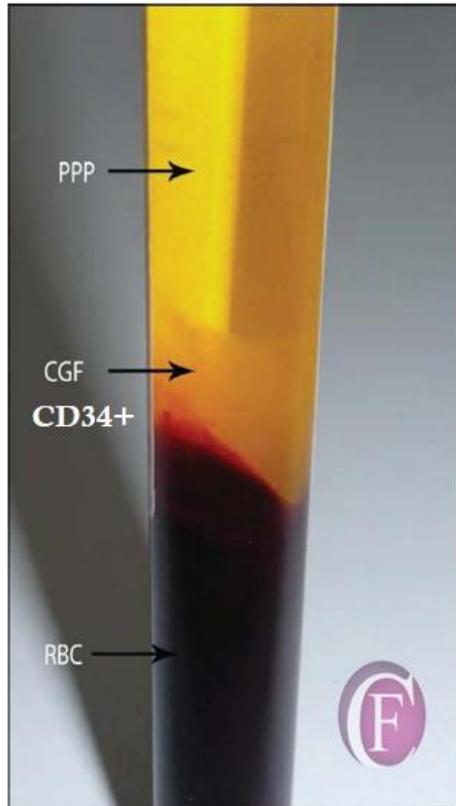
¿QUÉ ES EL CGF?

- ◉ Factores de crecimiento concentrados (CGF) biomaterial denominado “segunda generación de PRP”
- ◉ CGF es una tecnología moderna (SPEED GRADIENT, Silfradent®) de centrifugación en gradiente, diferenciada, que permite la extracción de CGF rico en células CD34+ y factores de crecimiento.
- ◉ En el CGF están presentes: TGF-b1, VEGF y células CD34+



Rodella, L. F., Favero, G., Boninsegna, R., Buffoli, B., Labanca, M., Scari, G., Sacco, L., Batani, T. & Rezzani, R. (2011). Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech* 74, 772-7.

La Bala “Mágica”



Factores de crecimiento (Conc.)

PDGF AB ~100-300 ng/mL

PDGF BB ~10-15 ng/mL

PDGF AA ~1-5 ng/mL

TGF β 1 ~90-400 ng/mL

TGF β 2 ~0.5 ng/mL

VEGF ~10-30 ng/mL

EGF ~30 ng/mL

IGF ~50-200 ng/mL

+ High effect

- Whithout effect

*In direct effect

	Prolif. Pre Osteob.	Prolif. Fibroblastos	Quimio taxis	Sint. Matrix extra Cel	Vascularización
PDGF	++	++	+	+	*
TGF	+/-	+/-	+	++	*
EGF	-	++	+	++	-
IGF	++	+	++	++	-
VEGF	*		-	-	++

Rodella *et al.* Mic. Res. Tech. 2011. 74:772-777

ACTIVADOR PLASMA GEL

- Al colocarlo en el sistema de activación de albúmina (APAG) y agregarle ozono, potenciamos aún más la regeneración celular.
- El activador de plasma genera un calor progresivo que llega a 75°C lo que permite la integridad y actividad de la célula.
- Se colocan las jeringas de 1 y 3cc de PRP en el activador durante 10-15 min



GEL ESTIMULADOR DE FIBROBLASTOS BIO-MATRIX GEL FILLED



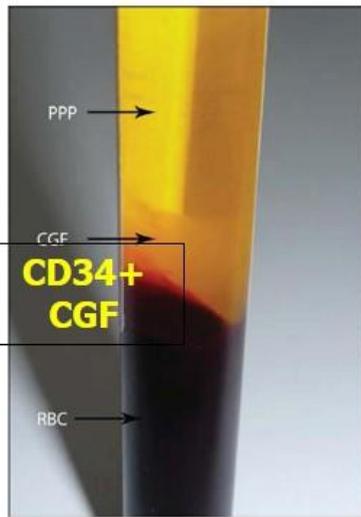


FOTO Aplicación

Concentrador de células



RESULTADOS

- ◉ Se comprobó que las plaquetas comienzan a secretar activamente estas sustancias 10 minutos después de la formación del coágulo, liberándose más del 95% de los factores de crecimiento pre-sintetizados en el lapso de 1 hora.
- ◉ Se comprobó que tras esta liberación proteica masiva, las plaquetas sintetizan y secretan proteínas de forma adicional durante 5 a 10 días más.
- ◉ Cuando la influencia de las plaquetas comienza a remitir, los macrófagos que han llegado al foco merced del crecimiento vascular promovido por las plaquetas, estos asumen la regulación de la reparación tisular mediante la secreción de sus propios factores.
- ◉ 2010 L. RE, G. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. PEREZ-DAVISON, M. SIRITO. Role of Ozone/Oxygen in Fibroblast Growth Factor Activation. Discovering the Facts. *International Journal of Ozone Therapy* 9: 55-58



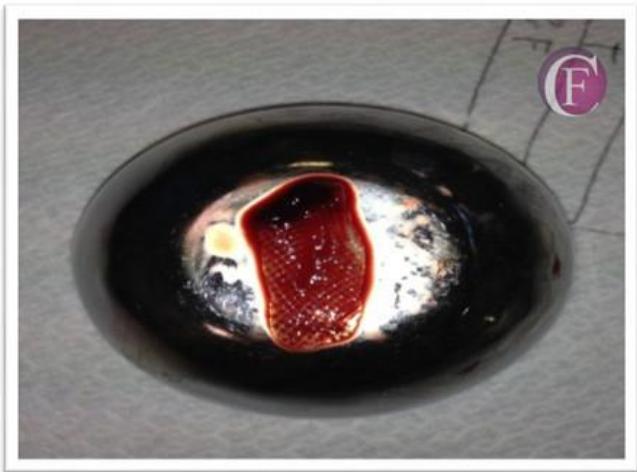
RESULTADOS

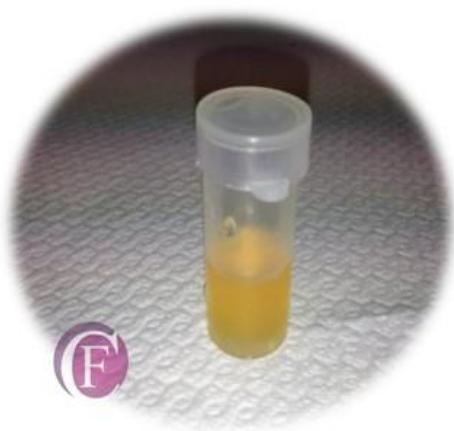
- ◉ La Diabetes Mellitus tipo 2 representó el 85,7 %.
- ◉ El género femenino predominó, 71,5 %.
- ◉ El 85,8 % estuvo representado por el pie diabético neuro-infeccioso .
- ◉ El 69,1 % perteneció al grado 2 y 3 de la clasificación de Wagner.
- ◉ Entre las 12-18 semanas de tratamiento el 93,2 % presentó epitelización total a la aplicación del ozono, CGFO3 y PLASMA GEL.
- ◉ En promedio el tejido de granulación apareció a los 10 días.
- ◉ Los 10 pacientes de control se mantuvieron en insuficiencia cicatricial, sin evolución significativa.

RESULTADOS

- ◉ El presente estudio demostró que ozono local y sistémico en combinación con la aplicación de factores de crecimiento y CGF, son un método eficaz y seguro para acelerar la curación de las úlceras del pie diabético y prevenir la necesidad de amputación en los estadios II y III de Wagner.















MUCHAS GRACIAS

