EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO HUMANO RECOMBINANTE ACELERA LA CICATRIZACION DE QUEMADURAS EN NIÑOS. ESTUDIO A DOBLE CIEGAS

Harley A. Borges[1], Alejandro Martínez[2], Luz Divina López[2], Efraín V. Ung Lau[3], Maura M. Wade[4], Carlos M. Mella[5], Francisco Hernández[5], Tania González[5], Pedro A. López Saura[5]

Enviar correspondencia a: Francisco Hernández Bernal[5].

[1]*Instituto Superior de Medicina Militar "Luis Díaz Soto". Carretera Monumental, Km. 3, Habana del Este,* [2]*Hospital Clínico-Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras". San Lázaro # 701, Centro Habana.* [3]*Hospital Pediátrico "William Soler". San Francisco y Perla, Alta Habana, Ciudad de La Habana.* [4]*Ministerio de Salud Pública. N y 23, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana.* [5]*División de Ensayos Clínicos y Preclínicos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba.*

Recibido en julio de 1994. Aprobado en noviembre de 1994.

Key words: Epidermal Growth Factor, burn healing, cutaneous application, clinical trial.

SUMMARY

We have done a double blind, fase II clinical trial. Critically and extremely critically ill cases were excluded. Twenty pediatric patients were randomly distributed in a control or study group treated with 1% Silver Sulfadiacine without or with 10 μg/g human recombinant Epidermal Growth Factor (EGF) respectively. Healing time of deep dermic burns was reduced from 15.9 ± 5.6 days in the control group to 10.6 ± 3.1 days in the EGF treated patients ($p < 0.001$). In hypodermic burns the difference was also significant, from 21.5 ± 2.5 to 17.6 ± 4.5 days ($p < 0.01$). Quality of healing was good, resulting in a skin with appearance, colour and elasticity similar to normal tissue. No hypertrophic scars were observed.

RESUMEN

Se realizó un ensayo clínico fase II, controlado y a doble ciegas. No se incluyeron casos clasificados como críticos o críticos extremos. Veinte pacientes fueron distribuidos aleatoriamente a los grupos de estudio o de control. En el grupo de estudio se empleó el Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (10 μg/g) en crema hidrófila de sulfadiacina de plata al 1% y en el grupo de control, crema de sulfadiacina de plata al 1%. El tiempo de cicatrización de las quemaduras dérmicas profundas fue reducido de 15.9 ± 5.6 días en el grupo control a 10.6 ± 3.1 días en los pacientes tratados con Factor de Crecimiento Epidérmico ($p < 0.001$). En las quemaduras hipodérmicas, la diferencia fue también significativa, de 21.5 ± 2.5 a 17.6 ± 4.5 días ($p < 0.01$). La calidad de la cicatrización fue buena, resultando una piel de apariencia, color y elasticidad similar a la normal, sin la formación de cicatrices hipertróficas.

INTRODUCCION

Las quemaduras constituyen una puerta abierta a la entrada de cuerpos extraños y gérmenes patógenos, y salida de líquidos orgánicos. Las mismas, en ocasiones, pueden llevar a una descompensación hemodinámica acompañada de alteraciones electrolíticas, hematológicas y gasométricas. Con la finalidad de disminuir estas consecuencias y evitar complicaciones mayores, es necesario el cierre de estas lesiones.

En materia de cicatrización, muchas quemaduras hipodérmicas de más de 1% de superficie corporal dejan zonas que debemos injertar para obtener una cicatrización rápida y sin secuelas. Por otra parte, las quemaduras dérmicas profundas constituyen una incertidumbre, porque son estas lesiones las que con mayor frecuencia se profundizan trayendo como consecuencia el agravamiento de los pacientes. Por lo tanto, es deseable disponer de un tratamiento que acelere el proceso de cicatrización.

Después del aislamiento del Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE), se han realizado diversos ensayos que demuestran su efecto sobre la cicatrización en modelos experimentales de quemaduras y heridas (Cohen, 1962; Savage *et al.*, 1972; Carpenter *et al.*, 1975, 1979 y 1981).

El FCE y su receptor han sido localizados en distintas células que componen la piel. Los queratinocitos, las células del *ductus* de las glándulas sudoríparas, folículo piloso, células mioepiteliales, músculo liso epitelial y las células musculares responsables de la piloerección, exhiben un elevado número de receptores (Martin *et al.*, 1992). Se ha reportado que el FCE es capaz de acelerar la cicatrización de quemaduras en la piel de los cerdos, con una mayor regeneración fisiológica del epitelio

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

dañado, lo que ofrece ventajas funcionales y estéticas (Nial *et al.*, 1982). Otras investigaciones han descrito que el FCE es un potente agente mitogénico para gran variedad de células y tejidos incluyendo células epiteliales y fibroblastos (Carpenter *et al.*, 1979; Buckley *et al.*, 1985). Se ha demostrado que la aplicación tópica de este producto en modelos experimentales en animales produce una aceleración en la regeneración epidérmica en las quemaduras y zonas donantes de piel (Artuson, 1984).

Brown *et al.* (1989) reportan un tiempo de cicatrización significativamente más corto en las personas que recibieron FCE en zonas donantes en un estudio a doble ciegas llevado a cabo en pacientes con la aplicación del FCE combinado con sulfadiacina de plata, comparado con sulfadiacina de plata sola.

Otros estudios reportan eficacia del FCE en el tratamiento de lesiones ulcerosas de miembros inferiores de etiología post-flebítica, en úlceras cutáneas producidas por radiaciones ionizantes o extravasación de citostáticos y en úlceras radiógenas (Quiñones *et al.*, 1991; Barroso *et al.*, 1989 y 1993).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y los favorables resultados obtenidos en las evaluaciones preclínicas (Mateo de Acosta *et al.*, 1989; Esquivel *et al.*, 1993a y b; Morín *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 1993) con el Factor de Crecimiento Epidérmico humano obtenido por vía del ADN recombinante (FCE-hr), se decidió la realización de este ensayo clínico en pacientes pediátricos portadores de lesiones por quemaduras, para evaluar la eficacia del FCE-hr en la epitelización de las quemaduras dérmicas e hipodérmicas, así como en la calidad de la cicatrización de las lesiones.

MATERIALES Y METODOS

Se diseñó un estudio fase II, aleatorizado, controlado y a doble ciegas, para obtener una primera evidencia de eficacia, por lo que se escogió una muestra relativamente pequeña en el Servicio de Caumatología del Hospital Pediátrico "William Soler".

La muestra estuvo constituída por 20 pacientes de 1 a 14 años de edad, portadores de quemaduras dérmicas e hipodérmicas producidas por agentes físicos (térmicos) tales como el flash, fuego directo, líquidos calientes, líquidos inflamables, vapor de agua y fricción. Las lesiones producidas por agentes químicos y la electricidad no se incluyeron.

Se excluyeron los pacientes diabéticos, con enfermedades inmunológicas y dermatológicas, quemaduras mayores de un 15% de superficie corporal, pacientes con más de 24 h de evolución y las quemaduras hipodérmicas mayores de 1% de superficie corporal.

Según lo referido en el ***Manual de Procedimientos de Diagnóstico y Tratamiento de Caumatología y Cirugía Plástica*** (Borges *et al.*, 1986) las lesiones fueron clasificados como quemaduras dérmicas superficiales **-A-** (lesiones rosadas, muy dolorosas, que forman ampollas por presentar plasmorrea clara, decolan y su consistencia es normal), dérmicas profundas **-AB-** (lesiones de color rojo cereza, dolorosas, que forman ampollas por presentar plasmorrea turbia, decolan fácilmente y su consistencia es normal); hipodérmicas **-B-** (lesiones cuyo color varía desde el blanco nacarado, dorado hasta negro, indoloras, que no forman ampollas por no presentar plasmorrea, son secas, decolan de acuerdo a la profundidad y su consistencia aumenta en relación directa con la profundidad).

La asignación de los pacientes a cada grupo (control y estudio) se realizó de manera aleatoria, según una tabla de números aleatorios generada automáticamente en un ordenador, con igual tamaño para cada grupo, siendo el número de inclusión consecutivo, según la lista, a partir del primer paciente. Las dos cremas tenían semejantes características organolépticas y de envase, siendo estos últimos etiquetados con el número de inclusión del paciente. Esta operación fue realizada por los monitores del estudio, de manera que se garantizó el enmascaramiento del tratamiento para los investigadores.

En el grupo de estudio se usó FCE-hr obtenido a partir de una cepa transformada de *Saccharomyces cerevisiae* (Cinza *et al.*, 1991) en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) añadido al 0.1% en crema hidrófila con sulfadiacina de plata al 1% (Hebermin). El grupo control recibió crema hidrófila de sulfadiacina de plata al 1% (SDP).

Al momento del ingreso los pacientes fueron sometidos a examen clínico de sus lesiones. Se procedió a lavarlas con las soluciones antisépticas habituales (Cetavlón®, Tego® o Hibitane® acuoso) y se realizó excéresis de los necroepitelios, seguida del secado y toma de fotografía. Las curas se realizaron en días alternos hasta el día 25 o hasta el cierre total de las lesiones, aplicando la crema en estudio de forma que quedase una capa de 1 mm de espesor y ocluyendo las lesiones con compresas de gasa estéril. Los pacientes se mantuvieron ingresados todo el tiempo que duró el tratamiento.

En cada cura se observó el progreso del proceso de epitelización de cada lesión hasta el cierre total. Se realizó el seguimiento de los pacientes para conocer la calidad de la cicatrización al mes, a los tres y a los seis meses de haber comenzado el tratamiento.

Como quemadura epitelizada en cualquiera de sus formas clínicas, se definió aquella lesión que presentara continuidad de la capa epitelial de forma íntegra, sin trasudación de líquido o plasma y sin la presencia de vesículas ni zonas cruentas.

La unidad básica de evaluación fue cada lesión. Se consideró una lesión como una región anatómica con una profundidad de quemadura dada. La superficie corporal quedó dividida en 35 regiones. Las variables básicas de respuesta fueron el tiempo que demoró la epitelización de las lesiones (en días) y la calidad de la cicatrización como ***buena*** (plana, normocrómica, con sensibilidad y elasticidad normal y ausencia de sequedad, fragilidad y aspereza), ***regular*** (hipercrómica, hipocrómica o acromía, con elasticidad disminuida, moderada sequedad, fragilidad o aspereza y moderada hipertrofia e hipersensibilidad, hipoestesia, dolor espontáneo o prurito), ***mala*** (marcada hipercromía, hipocromía o acromía, falta de elasticidad, marcada sequedad, fragilidad o aspereza, severa hipertrofia e hiperestesia, hipoestesia, anestesia, dolor espontáneo o prurito) y presencia o no de ***queloide*** (cicatriz de aspecto redundante que invade los tejidos vecinos no lesionados, con sensación de dolor, prurito y aumento de la vascularización). La calidad de la cicatrización se midió entre 6 y 12 meses después

del alta hospitalaria. Las variables explicativas fueron el tratamiento recibido con el producto de estudio y el tipo de lesión según profundidad. Las variables de control fueron la edad, sexo, color de la piel y el agente etiológico.

El análisis estadístico se dirigió especialmente a la identificación de diferencias entre los dos grupos de tratamiento en el tiempo de epitelización. Se calculó el promedio y la desviación estándar de la variables de respuestas para cada grupo de tratamiento y las comparaciones se hicieron mediante la prueba t de Student. Se fijó un nivel de significación de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Se evaluaron los 20 pacientes que componían la muestra. Todos los pacientes completaron el tratamiento según estuvo previsto. Se cumplió con la aleatorización y no se excluyó ningún paciente. En la tabla 1 se presentan las características demográficas y de base de los pacientes. La distribución por edades registró la mayor frecuencia entre 1 y 5 años con 11 pacientes, siguiéndole en orden 8 pacientes comprendidos entre los 11 y 14 años de edad. Sólo 1 paciente estuvo comprendido entre los 6 y 10 años de edad. La distribución por sexos presentó un mayor número de pacientes masculinos con un 60% del total y según el color de la piel mostró un 70% de pacientes blancos y un 30% de negros y mestizos. Con relación al agente etiológico, en el 50% fueron los líquidos hirvientes, en el 35% los derivados del petróleo y en el 15% la manteca caliente. Ambos grupos fueron homogéneos en los aspectos antes señalados, así como en cuanto a la profundidad de las lesiones.

Tabla 1
Características demográficas y de base de los pacientes por grupos de tratamiento

Variables		SDP + FCE-hr	SDP	Total
Edad (años)	1-5	6	5	11
	6-10	1	0	1
	11-14	3	5	8
Sexo	Masculino	6	6	12
	Femenino	4	4	8
Color de la piel	Blanca	7	7	14
	Negra	1	2	3
	Mestiza	2	1	3
Lesiones	A	27	28	55
	AB	38	34	72
	B	12	13	25
	Total	77	75	152

En la tabla 2 se presenta la evolución de las lesiones en ambos grupos. El total de días que demoró la cicatrización fue significativamente menor en el grupo que recibió FCE-hr. En las lesiones dérmicas superficiales no hubo diferencias significativas. En las quemaduras dérmicas profundas e hipodérmicas, disminuyó el tiempo de cicatrización o de preparación del lecho para injerto en el grupo tratado con FCE-hr en aproximadamente 5 y 4 días, respectivamente. Las diferencias encontradas resultaron altamente significativas a favor del grupo que recibió FCE-hr.

En el seguimiento a largo plazo, al año de evolución se observó que la piel lesionada tenía textura normal, alteraciones de la coloración -mínimas tanto en extensión como en intensidad- y no se constató la formación de cicatrices hipertróficas ni queloides. En la figura 1 se muestra uno de los casos antes y después del tratamiento con FCE-hr.

DISCUSION

La validez de los resultados obtenidos se sustenta en el hecho del alto porcentaje de cumplimiento con el tratamiento, ya que los pacientes permanecieron ingresados y fueron evaluados en cada cura.

Tabla 2
Epitelización de las lesiones según el uso de FCE-hr y profundidad.

Tipo de Quemadura	Condición	Tiempo de cicatrización (días)				
		Número de lesiones	Media ± DS	Mínimo	Máximo	p
A	sin FCE-hr	28	9.39 ± 3.53	5	21	n.s.
	con FCE-hr	27	9.59 ± 2.47	4	15	
AB	sin FCE-hr	34	15.94 ± 5.60	6	23	< 0.001
	con FCE-hr	38	10.63 ± 3.11	7	17	
B*	sin FCE-hr	13	21.54 ± 2.47	17	23	< 0.01
	con FCE-hr	12	17.58 ± 4.46	12	23	
Todas	sin FCE-hr	75	14.08 ± 3.83	5	23	< 0.001
	con FCE-hr	77	11.22 ± 3.39	4	23	

*Se refiere al tiempo en que estuvo listo el lecho para injerto.

Fig. 1: Paciente tratado con FCE-hr. (a) antes de iniciar el tratamiento: quemaduras dérmicas superficiales y profundas, e hipodérmicas B, con menos de 24 h de evolución; (b) después de 14 días de evolución: la zona diagnosticada hipodérmica lista para ser injertada.

El efecto beneficioso del Factor de Crecimiento Epidérmico se manifestó en las quemaduras dérmicas profundas al disminuir el tiempo de cicatrización, obteniéndose diferencias altamente significativas. En las quemaduras hipodérmicas de menor extensión ocurrió una cicatrización más rápida que en lesiones similares del grupo control; en las de mayor extensión se obtuvo un tejido de granulación óptimo permitiendo una injertación más adecuada.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Brown *et al.* (1986 y 1989), lo que indica que ésta proteína, combinada con sulfadiacina de plata, acelera la cicatrización de las lesiones por quemaduras con respecto al tratamiento de sulfadiacina sola.

Este efecto estimulante de la cicatrización podría explicarse porque el FCE es una molécula con actividad mitogénica, no sólo para células epiteliales sino también para fibroblastos (Buckley *et al.*, 1985), lo que ha sido encontrado también en sistemas experimentales *in vivo*. Se ha reportado que el tratamiento tópico reiterado sobre la región dorsal de ratas provoca hiperplasia y aumento de la queratinización y en el caso particular de los fibroblastos y células endoteliales se observa un incremento de la producción de las proteínas de la superficie celular o de fibronectina, la cual proporciona la sustancia de sustrato requerida para el crecimiento y la diferenciación de la epidermis (Gospodarowicz, 1981).

Por otra parte, el tratamiento con FCE-hr en crema de sulfadiacina de plata al 1% dió como resultado una piel de apariencia, elasticidad y color prácticamente idéntica a la normal sin la formación de cicatrices hipertróficas.

Una de las limitaciones de este trabajo fue la necesidad, por razones éticas, del empleo del FCE-hr en crema hidrófila con sulfadiacina de plata que constituye uno de los tratamientos habituales en estos casos, no pudiéndose conocer el efecto del FCE-hr sólo, lo cual es evaluado en modelos animales.

Este reporte constituye el primer resultado de uso tópico del FCE en el tratamiento de las quemaduras en humanos. Aunque la muestra estudiada fue muy pequeña para llegar a conclusiones sobre la eficacia del FCE en quemaduras, los favorables resultados de este trabajo indican la factibilidad de continuar estas investigaciones para ampliar las perspectivas de aplicación de esta molécula.

REFERENCIAS

ARTUSON, G. (1984). Epidermal Growth Factor in the healing of corneal wounds, epidermal wounds and partial thickness scalds. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **18**:33-37.

BARROSO, M.C.; R. FONSECA; J. ALERT; S. ALSINA; E. VÁZQUEZ; J. LOMBARDERO y R. PÉREZ (1989). Efecto del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante sobre úlceras cutáneas: reporte preliminar. *Interferón y Biotecnología* **6(1)**:57-61.

BARROSO, M.C.; C. DÍAZ; S. ALSINA; F. ARECES and E. VÁZQUEZ (1993). Human recombinant epidermal growth factor in the treatment of radiogenic ulcers. *Biotecnología Aplicada* **10(1)**:12.

BORGES, H.A.; R. GARCÍA y G. GONZÁLEZ (ed) (1986). *Manual de Procedimientos de Diagnóstico y Tratamiento de Caumatología y Cirugía Plástica.* Editora Nacional.

BROWN, G.L.; L. CURTSINGER; J.R. BRIGHTWELL; D.M. ACKERMAN; G.R. TOBIN; M.C.JR. POLK; C. GEORGE-NASCIMENTO; P. VALENZUELA and G.S. SCHULTZ (1986). Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic Epidermal Growth Factor. *J. Exp. Med.* **163**:1319-1324.

BROWN, G.L.; L.B. NANNEY; J. GRIFFEN; A.B. CRAMER; J.M. YANCEY; L.J. CURTSINGER; L. HOLTZIN; G.S. SCHULTZ; M.J. JURKIEWICZ and J.B. LYNCH (1989). Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N. Engl. J. Med.* **321**:76-79.

BUCKLEY, A.; J.M. DAVIDSON; C.G. KAMERATH; T.B. WOLT and S.C. WOODWARD (1985). Sustained release of Epidermal Growth Factor accelerates wound repair. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82**:7340-7344.

CARPENTER, G. and S. COHEN (1975). Human Epidermal Growth Factor. Isolation and Chemical and Biological Propeties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1317-1321.

CARPENTER, G and S. COHEN (1979). Epidermal Growth Factor. *Ann. Rev. Biochem.* **48**:193-216.

CARPENTER, G. and S. COHEN (1981). Receptor interactions on the stimulation of cell growth. *Receptor Regulation.*

COHEN, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* **237**:1555-1562.

CINZA, A.M.; M. QUINTANA; J. LOMBARDERO; R. POUTOU; E. PÉREZ; L.C. PÉREZ; C.M. MELLA; V. BESADA; G. PADRÓN; L. CASTELLANOS; R. ESTRADA and J. MORALES-GRILLO (1991). A batch process for production of human Epidermal Growth Factor in yeast. Product characterization. *Biotecnología Aplicada* **8(2)**:166-174.

DÍAZ, A.; J. BERLANGA y R. LAZCANO (1993). Evaluación teratogénica del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante en ratas. *Biotecnología Aplicada* **10(1)**:14.

ESQUIVEL, I.; F.O. CASTRO y A.D. DURNIEV (1993 a). El Factor de Crecimiento Epidérmico no produce mutaciones dominantes letales en células reproductivas de ratones. *Biotecnología Aplicada* **10(1)**:6.

ESQUIVEL, I.; F.O. CASTRO y A.D. DURNIEV (1993 b). El Factor de Crecimiento Epidérmico no provoca daños cromosómicos en las células de médula ósea de ratones. *Biotecnología Aplicada* **10(1)**:7.

GOSPODAROWICZ, D. (1981). Epidermal and nerve growth factors in mammalian development. *Annu. Rev. Physiol.* **43**:251-265.

MARTIN, P.; J. HOPKINSON-WOOLLEY and J. McCLUSKEY (1992). Growth factors and cutaneous wound repair. *Progr. Growth Factor. Res.* **4**:1-24.

MATEO DE ACOSTA, C.; E. JUSTIZ and A. Lage (1989). Studies on the Epidermal Growth Factor. V. EGF biodistribution in nude and xenotransplanted mice. *Interferón y Biotecnología* **6(3)**:265-272.

MORÍN, M.A.; L.C. PÉREZ; E. CISNEROS Y L. MANSO (1993). Estudio de penetrabilidad del Factor de Crecimiento Epidérmico humano aplicado por vía tópica en ratones. *Biotecnología Aplicada* **10(1)**:9.

NIAL, M.; G. RYAN and B. O'BRIEN (1982). The effect of Epidermal Growth Factor on wound healing on mice. *Journal of Surgical Research* **33**:164-169.

QUIÑONES, M., J. McCOOK, E. ZACCA y M.A. MARTÍNEZ (1991). Efecto del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante sobre las úlceras de miembros inferiores causadas por insuficiencia venosa crónica. *Progreso en Ciencias Médicas* (Venezuela) **5**:11-14.

SAVAGE, C.R.; T. INAGAMI and S. COHEN (1972). Epidermal Growth Factor and a new derivate. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J. Biol. Chem.* **247**:7609-7611.