

Medición de plaquetas y linfocitos en exudados de heridas, relacionándolas con las fases de cicatrización

SALVADOR CERVERÓ FERRAGUT¹; NATIVIDAD LÓPEZ RIQUELME²;
JAIME POMARES VICENTE¹; ANA QUILES ANTÓN¹; ALBERTO POMARES GUIRAO³;
CONSOLACIÓN ROMERO VILAPLANA*⁴

¹ENFERMERO DE UNIDAD DE HOSPITALIZACIÓN A DOMICILIO – HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE

²DOCTORA EN QUÍMICA – LABORATORIO DE BIOQUÍMICA – HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE

³DIPLOMADO EN ESTADÍSTICA – HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE

⁴ENFERMERA GESTORA DE CASOS COMUNITARIA – CENTRO DE SALUD DE SAN FERMÍN DE ELCHE

DEPARTAMENTO DE SALUD ELCHE - HOSPITAL GENERAL

*Autora para correspondencia: romero_che@gva.es

Recibido: 20 de septiembre de 2022 – Aceptado: 4 de octubre de 2022

Apoyo financiero: Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital General Universitario de Elche (FISABIO).

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio es la cuantificación de plaquetas y linfocitos en exudado de las heridas y establecer su correlación con la fase de cicatrización presente.

Métodos: Se analizaron 110 muestras de exudado, pertenecientes a 37 pacientes, fueron recogidos con terapia de vacío negativo así como con un sistema de drenaje redon.

Resultados: Para la variable plaquetas, la prueba de ANOVA nos muestra diferencias significativas en el valor de la media según la fase en la que se encuentra, con el estadístico de contraste = 63,07 y $p < 0,01$. Para la variable linfocitos, la prueba ANOVA nos muestra diferencias significativas en el valor de la media dependiendo de la fase en la que se encuentra, con el estadístico de contraste = 14.61 y $p < 0,01$. Haciendo la prueba de Bonferroni (Bon = 2.688) se observa que el porcentaje de linfocitos en la fase inflamatoria (herida abierta) es menor que en la fase proliferativa (herida cerrada). Y el número de plaquetas en la fase inflamatoria (herida abierta) es mayor que la encontrada en la fase proliferativa (herida cerrada).

Conclusión: La cuantificación de plaquetas y linfocitos en el lecho de la herida, permite identificar la fase de cicatrización en la que nos encontramos actualmente y establecer las opciones terapéuticas adecuadas.

Palabras clave: Linfocitos – Plaquetas – Exudado – Cicatrización.

Abstract

Platelet and lymphocyte contents in wound exudates: roles in the stages of healing

Objective: The goal of this study is the quantification of platelets and lymphocytes on wounds' exudate and establish their correlation with the present cicatrization phase.

Methods: 110 exudate samples were analyzed, which belonged to 37 patients, they were collected with negative vacuum therapy as well with a redon-drainage system.

Results: For the platelets variable, the ANOVA test shows us significant differences at the mean's value depending on the phase it is found with the contrast statistic = 63.07 and $p < 0.01$. For the lymphocytes variable, the ANOVA test shows us significant differences at the mean's value depending on the phase it is found with the contrast statistic = 14.61 and $p < 0.01$. By doing the Bonferroni's test (Bon = 2.688) it is observed that the percentage of lymphocytes in the inflammatory phase (open wound) is lesser than in the proliferative phase (closed wound). And the number of platelets in the inflammatory phase (open wound) is greater than those found in the proliferative phase (closed wound).

Conclusion: The quantification of platelets and lymphocytes on the wound bed, allows us to identifying the cicatrization phase on which we currently are and establish the proper therapeutic options.

Keywords: Lymphocytes – Platelets – Exudate – Wounds healing.

INTRODUCCIÓN

La función de las plaquetas en los procesos de curación en las heridas, las ha dotado de gran interés para el diagnóstico y diferenciación de las fases de la cicatrización.

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos anucleados que circulan por los vasos sanguíneos en forma de disco biconvexo y su tiempo de vida media en sangre es de 7-10 días.

Cuando las plaquetas se adhieren al endotelio atraen más plaquetas, gracias a algunos componentes de los gránulos plaquetarios, liberando e influyendo sobre la proliferación leucocitaria, que juega un papel importante en la cicatrización de las heridas⁽¹⁾.

Las plaquetas desempeñan un papel crítico en la curación de heridas. En función de la fase en que se encuentre la herida, promueven activamente el reclutamiento de células, la regeneración de tejidos y la remodelación de la matriz, la angiogénesis y la maduración de los vasos sanguíneos⁽²⁾.

La liberación de histamina y heparina procedentes de los mastocitos es la responsable de la permeabilidad vascular, haciendo que el entramado celular que se concentra en la zona de la lesión pueda atravesar la pared endotelial para que cada célula (plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos) hagan su función correspondiente en cada una de las fases de la cicatrización.

En esta fase inflamatoria, los neutrófilos son las primeras células en llegar. Son las encargadas de eliminar el germen mediante fagocitosis y liberar factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos. Produce una muerte extracelular⁽³⁾, por lo que la inflamación se convierte en una autoagresión.

En esta fase inflamatoria, las células que predominan son las plaquetas, las cuales secretan una serie de factores proinflamatorios para atraer las células (macrófagos) que fagocitan los detritus, las bacterias y el tejido dañado.

Debido a las funciones desempeñadas por la inflamación en la lucha contra la infección y la inducción de la fase proliferativa, es una parte necesaria de la curación. Sin embargo, la inflamación puede conducir a daños en los tejidos si dura demasiado tiempo⁽⁴⁻⁵⁾.

Los macrófagos son células que intervienen tanto en la fase inflamatoria, como en la fase proliferativa y tienen varias funciones; una de ellas es la fagocitaria, por lo tanto son esenciales para la cicatrización de las heridas⁽⁶⁾. Después de transcurridos dos días de producida la herida, los macrófagos son las células más abundantes en la zona de la herida⁽⁷⁾. Los monocitos del torrente sanguíneo son atraídos a la zona de la herida por los factores de crecimiento liberados por las plaquetas y otras células, y posteriormente penetran la zona

de la herida atravesando las paredes de los vasos sanguíneos⁽⁸⁾. La presencia de monocitos en la herida alcanza su máxima proporción después de 24-36 h. de haberse producido la herida⁽⁹⁾. Una vez que se encuentran en la zona de la herida, los monocitos maduran y se transforman en macrófagos, que es la principal célula responsable de limpiar la zona de bacterias y residuos⁽⁶⁾.

El principal rol de los macrófagos es fagocitar bacterias y tejido dañado, también el último mediante la liberación de proteasas⁽¹⁰⁾. Los macrófagos secretan ciertos factores tales como factores de crecimiento y otras citoquinas, especialmente unos tres o cuatro días después de producirse la herida. Dichos factores atraen al área células que participan en la etapa de proliferación de cicatrización de la herida⁽¹¹⁾. El bajo contenido de oxígeno en la zona estimula a los macrófagos a producir factores que inducen e incrementan la velocidad de la neoangiogénesis⁽¹²⁾ y también estimulan a las células a producir la reepitelización de la herida, crear tejido granular, y formar una nueva matriz extracelular⁽¹³⁻¹⁴⁾. La capacidad de los macrófagos para secretar estos factores, los convierte en elementos vitales para promover que el proceso de cicatrización de la herida evolucione a la fase siguiente.

El linfocito es otro tipo de leucocito cuya función principal es la de identificar el antígeno y fabricar el anticuerpo, y representa el 24-32% de los glóbulos blancos en la sangre periférica. Dicha función la realizan casi siempre lejos de los puntos de agresión, su cuartel general son los ganglios.

En una infección, el reclutamiento de linfocitos aumenta en los ganglios gracias a la vasodilatación de la arteriola principal (vénula del endotelio alto) que alimenta a los ganglios linfáticos⁽¹⁵⁾.

Los linfocitos abandonan el torrente sanguíneo y retornan a él en forma repetida y a través del mismo tejido (por ej. ganglios linfáticos). Este fenómeno se conoce como la auto-dirección o recirculación (homing) de linfocitos. Es consecuencia de la expresión diferencial de moléculas de adhesión en los linfocitos y el endotelio de los vasos sanguíneos de los diferentes órganos en donde ocurre este fenómeno.

En cada paso de tiempo, un número constante de linfocitos T y linfocitos B entran en el nodo de la media de la linfa a través de varias vénulas de endotelio alto, distribuidos aleatoriamente dentro del área de las células T⁽¹⁶⁾.

Tan pronto como los antígenos llegan a los ganglios linfáticos, la densidad de linfocitos comienza a aumentar debido al flujo de entrada reforzada.

Siempre y cuando se detecta antígenos nuevos, la respuesta inmunitaria persiste: el número total de linfocitos aumenta monótonamente hasta 5 veces el valor original⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

De modo habitual, la identificación de cada una de las fases del proceso de cicatrización se realiza de manera subjetiva tras valorar los signos inflamatorios clásicos: rubor,

calor, dolor y edema del exudado. Además de estos signos, el examen del exudado (color, consistencia, y cantidad) pueden identificar la presencia de otros componentes, contaminantes o causas subyacentes, siempre con criterios subjetivos.

La fase proliferativa es caracterizada por angiogénesis, depósito de colágeno, formación de tejido de granulación y epitelización. En esta fase predominan las células endoteliales y fibroblastos, necesarios para la formación de nuevos vasos sanguíneos y una nueva matriz extracelular.

El exudado ayuda en la cicatrización, ya que evita que se seque el lecho de la herida, ayuda en la migración de las células reparadoras de tejidos, aporta nutrientes esenciales para el metabolismo celular, permite la difusión de factores inmunitarios y de crecimiento y ayuda a separar el tejido desvitalizado o lesionado⁽¹⁸⁾.

Sobre la base de estas consideraciones, el objetivo de este estudio ha sido la cuantificación de las poblaciones celulares, plaquetas y linfocitos, presentes en el exudado de las heridas tanto en la fase inflamatoria, como en la fase proliferativa y maduración y determinar su correlación con la fase de la cicatrización en que nos encontramos.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron 110 muestras de exudado de heridas pertenecientes a 37 pacientes, de los cuales 31 eran mujeres y 6 varones, con una media de edad de 59'8 años.

Para la obtención del exudado en heridas que cierran por segunda intención se ha utilizado la Terapia Asistencia por Vacío. Esta terapia está encaminada a promover la cicatrización de heridas en un medio húmedo y cerrado. Se trata de un método no invasivo, que utiliza la aplicación de vacío sobre la lesión para favorecer su curación⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

Cuando una herida es aséptica, incisa, no complicada y con poca pérdida de sustancia que permite la unión inmediata de los bordes mediante puntos de sutura, se dice que es una cicatrización por primera intención. El resultado es la curación con una reparación anatómica adecuada. En nuestra serie, y para este tipo de heridas, se han utilizado sistemas de drenaje de aspiración a baja presión denominados "redon": método de drenaje aspirativo continuo, formado por tubos de pilileno conectados a un depósito en el que se ha efectuado un vacío previo.

- 25 pacientes presentaban heridas post-quirúrgicas que cerraban por primera intención, de los cuales se recogieron 30 muestras a través del drenaje redon.
- 6 pacientes presentaban heridas post-quirúrgicas que cerraban por segunda intención, de los cuales se recogieron 16 muestras a través del sistema de terapia presión negativa.
- 6 pacientes presentaban úlceras por presión con

heridas que cerraban por segunda intención, de las cuales se recogieron 64 muestras a través del sistema de terapia presión negativa.

Los pacientes con tratamientos anticoagulantes fueron excluidos del estudio. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

En cada cura y recogida de muestra se evaluó la herida, mediante el método tradicional de observación directa, por el mismo profesional para evitar errores de observación.

Los parámetros macroscópicos que fueron observados de la herida para diferenciar la fase inflamatoria de la fase proliferativa fueron:

1. Dolor, tumor, rubor y calor.
2. Cantidad de exudado (leve, moderado, abundante).
3. Color del exudado (sérico, hemático, purulento).

La valoración macroscópica (subjetiva) determinó:

- Las 30 muestras de las heridas cerradas post-quirúrgicas (cierre por primera intención) estaban en fase proliferativa.
- De las 80 muestras de las heridas que cierran por segunda intención tenemos:
 - 29 muestras en fase proliferativa
 - 51 muestras en fase inflamatoria

Se recogieron 110 muestras; 51 muestras pertenecían a la fase inflamatoria de las heridas abiertas; 29 muestras pertenecían a la fase proliferativa de las heridas abiertas; y 30 muestras pertenecían a la fase proliferativa de las heridas cerradas. No hubo complicaciones clínicas.

Se ha realizado la cuantificación de dos tipos de células (plaquetas y linfocitos) en el exudado de heridas, en cada una de las fases de cicatrización (inflamatoria y proliferativa).

El exudado se recogió tanto del sistema de presión negativa como del drenaje redon con jeringa estéril. Las muestras fueron recolectadas en tubos con EDTA, analizándose el contenido celular en un contador de células (Advia 2120i Sistema de Hematología con Autoslide, Siemens, Erlangen, Alemania).

Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados con el programa SPSS 17.0 software estadístico. El análisis de varianza (ANOVA) se ha utilizado principalmente para ver si existen diferencias de una misma variable en más de dos poblaciones sobre la base a un valor de $p < 0.05$. En el caso de que el resultado del test ANOVA indique que existen diferencias significativas en alguna de las poblaciones, se tendrá que realizar comparaciones múltiples con el test de BONFERRONI para averiguar en qué poblaciones las medias son iguales o distintas. Hemos realizado la prueba de ANOVA para los linfocitos y para las plaquetas, y las poblaciones definidas son:

1. Fase inflamatoria heridas abiertas.

2. Fase proliferativa heridas abiertas.
3. Fase proliferativa heridas cerradas.

Después de realizar la prueba ANOVA para las dos variables (plaquetas y linfocitos), se ha realizado un contraste de hipótesis para averiguar si existe asociación entre las dos variables (nº de plaquetas y % de linfocitos).

RESULTADOS

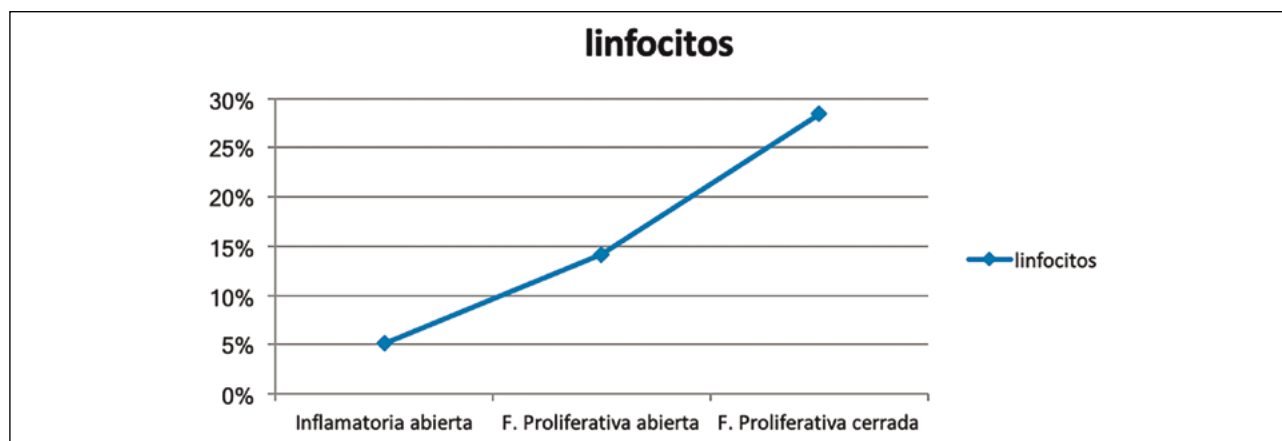
Para la variable Linfocitos, la prueba ANOVA nos indica que existen diferencias en las medias según la fase en la que se encuentra la herida. Con un estadístico contraste $EC=14.61$ y una $p < 0.01$; y realizando el test de Bonferroni ($Bon=2.688$) se observa, en las heridas abiertas, que el porcentaje de linfocitos en la fase inflamatoria (media=5.10%) es menor que en la fase proliferativa (media=14.14%) con un $EC=2.117$. En las heridas cerradas el porcentaje de linfocitos (media=28.46%) es significativamente mayor que en la fase proliferativa ($EC=3.022$) y que en la fase inflamatoria ($EC=5.32$) de las heridas abiertas.

Es decir, el porcentaje de linfocitos en la fase inflamatoria-herida abierta es menor que en la fase proliferativa-herida abierta y este es menor que en la fase proliferativa-herida cerrada (GRÁFICA 1).

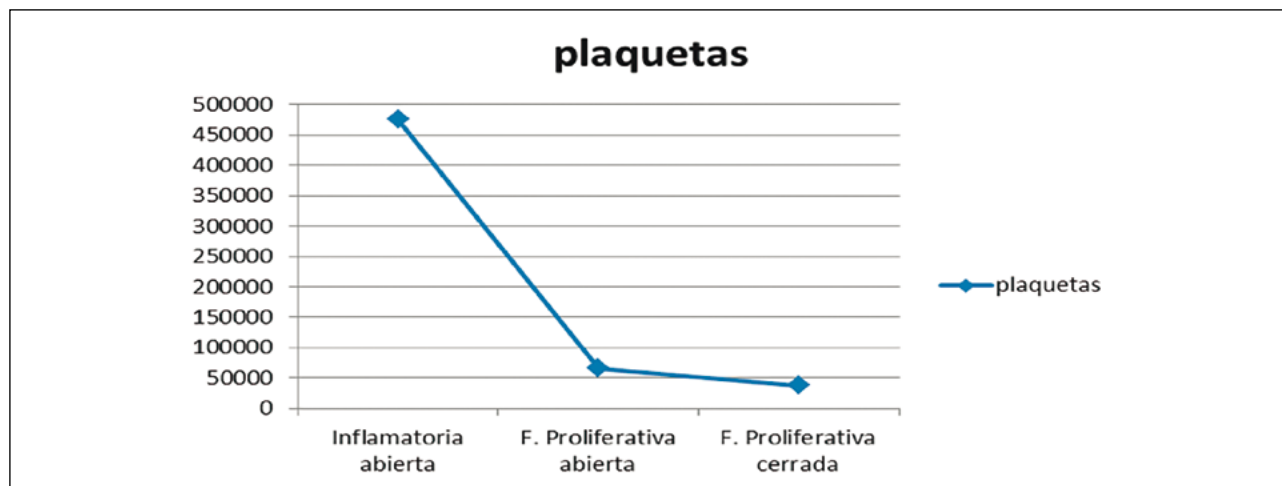
Para la variable Plaquetas, la prueba ANOVA nos indica que existen diferencias en las medias según la fase en la que se encuentra la herida. Con $EC=63.07$ y una $p < 0.01$; y realizando el test de Bonferroni ($Bon=2.688$) se observa, en las heridas abiertas, que el número de plaquetas en la fase inflamatoria (media=475.042) y la fase proliferativa (media=66.369) son diferentes ($EC=9.048$). En la fase inflamatoria es más elevado, mientras que cuando la herida está cerrada el número de plaquetas (media=37.833) es menor que la fase proliferativa ($EC=0.569$) y significativamente menor que la fase inflamatoria ($EC=9.407$).

Es decir, el número de plaquetas en la fase inflamatoria-herida abierta es mayor que en la fase proliferativa-herida abierta y este es mayor que en la fase proliferativa-herida cerrada (GRÁFICA 2).

La hipótesis nula de nuestro contraste es si el coeficiente



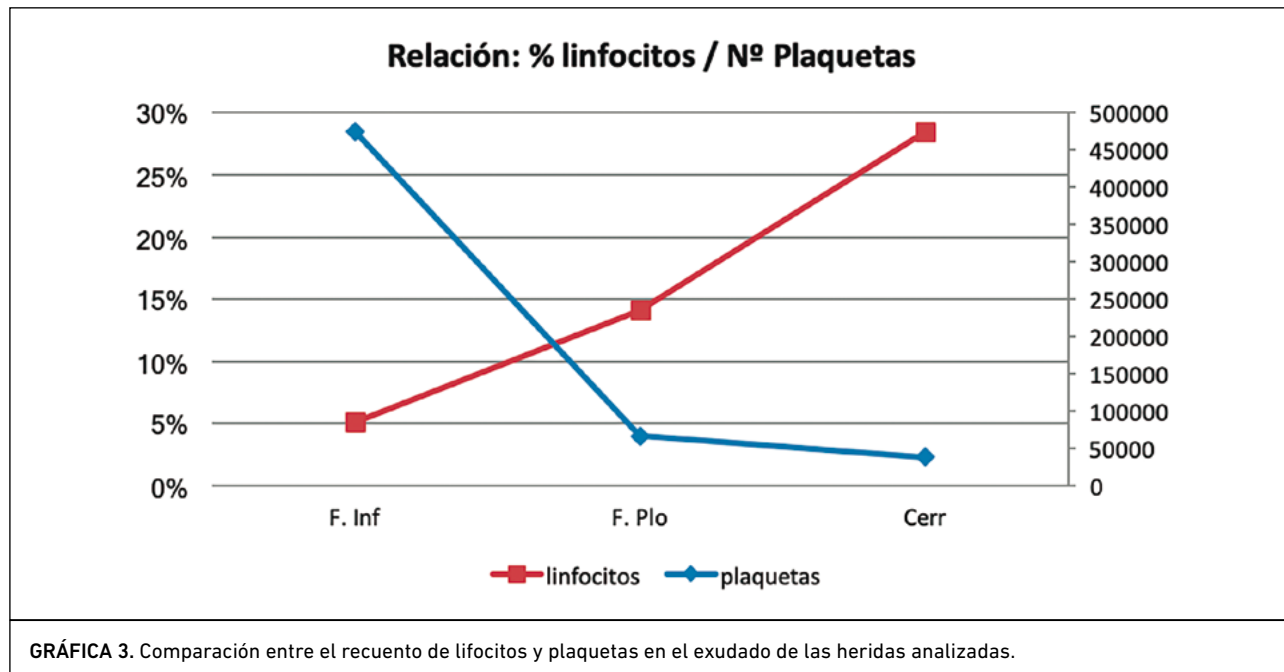
GRÁFICA 1. Recuento de linfocitos en el exudado de las heridas analizadas.



GRÁFICA 2. Recuento de plaquetas en el exudado de las heridas analizadas.

Artículo Original

Medición de plaquetas y linfocitos en exudados de heridas, relacionándolas con las fases de cicatrización



GRÁFICA 3. Comparación entre el recuento de linfocitos y plaquetas en el exudado de las heridas analizadas.

de correlación es igual a 0; y ha salido un $EC = -3.673$, con una $p < 0.001$; por lo que podemos decir que existen evidencias estadísticamente significativas que nos indica que existe una asociación entre ambas variables. Observando el valor de la correlación de Pearson (-0.333) podemos decir que tiene una relación inversa: cuando el número de plaquetas es mayor, menor es el porcentaje de linfocitos y viceversa (GRÁFICA 3).

DISCUSIÓN

Se analizaron 110 muestras de exudados de heridas. El método de la recolección de muestra fue con drenajes con vacío.

En el estudio se han podido diferenciar las tres fases de cicatrización según los contajes celulares de las plaquetas y linfocitos en los exudados de las heridas, utilizando el método Anova y el test de Bonferroni.

A pesar de las dificultades en las mediciones celulares a pie de cama de los exudados de las heridas para determinar las fases de inflamación, proliferación y maduración, harían falta más estudios sobre componentes celulares y bioquímicos para determinar dichas fases.

Valdría mencionar algunos artículos relevantes sobre mediciones celulares y parámetros bioquímicos⁽²¹⁻²⁵⁾.

El grupo investigador sigue trabajando en la localización de parámetros celulares y bioquímicos en las heridas para la determinación de las fases de cicatrización de las heridas.

CONCLUSIÓN

En la fase inflamatoria las células que predominan son las plaquetas, las cuales secretan una serie de factores proinflamatorios para atraer las células que fagocitan. En nuestra significación estadística, constatamos niveles elevados de plaquetas en heridas definidas como fase inflamatoria, sobre la base de estimación subjetiva. Sin embargo la significación estadística de los linfocitos avala la hipótesis con cifras bajas durante la fase inflamatoria en el lecho de la herida.

Este análisis cuantitativo de linfocitos y plaquetas que se encuentran en el lecho de la herida permite disponer de información para un mejor diagnóstico de la fase de cicatrización en que nos encontramos y poder actuar correctamente en el tratamiento.

Sobre la base de estas conclusiones, el equipo investigador propondría incidir en la investigación de la cuantificación de las estirpes celulares implicadas en la inmunidad innata y adquirida, para poder establecer la fase de cicatrización en que nos encontramos y optimizar el abordaje terapéutico de las heridas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital General Universitario de Elche (FISABIO) por su apoyo financiero de este estudio. ●

Bibliografía

- [1] KAUL E.S., WAACK B.J., PADGETT R.C., BRROKS R.M., HESTAAD D.P. Altered vascular response to platelets from hypercholesterolemic humans. *Cir Res* 1993; 72:237-43.
- [2] RADZIOW-BALICKA A., MONCADA DE LA ROSA C., JURASZ P. Platelet-associated angiogenesis regulating factors: a pharmacological perspective. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 Jun; 90(6):679-688.
- [3] MALE, D.K., CHAMPION, B., COOKE A., OWEN M. Cell troffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London-New York 1991.
- [4] GREENHALGH D.G. The role of apoptosis in wound healing. *nt J Biochem Cell Biol*. 1998 Sep.; 30(9):1019-1030.
- [5] MIDWOOD K.S., WILLIAMS L.V., SCHWARZBAUER J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jun; 36(6):1031-1037.
- [6] DE LA TORRE J., SHOLAR A. Wound healing: Chronic wounds. 2006. Emedicine.com.
- [7] EXPERT REVIEWS IN MOLECULAR MEDICINE. The phases of cutaneous wound healing. 2003; 5:1. Cambridge University Press.
- [8] LORENZ H.P., LONGAKER M.T. Wounds: Biology, Pathology, and Management. 2003. Stanford University Medical Center.
- [9] SANTORO M.M., GAUDINO G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research*. 2005. 304 (1): 274-286. PMID 15707592.
- [10] DEODHAR A.K., RANA R.E. Surgical physiology of wound healing: a review. *Journal of Postgraduate Medicine* 1997; 43 (2): 52-56. PMID 10740722.
- [11] ROSENBERG L., DE LA TORRE J. Wound Healing, Growth Factors. 2006. Emedicine.com.
- [12] GREENHALGH D.G. The role of apoptosis in wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1998; 30 (9): 1019-1030.
- [13] MERCANDETTI M., COHEN A.J. Wound Healing: Healing and Repair. 2005. Emedicine.com.
- [14] STASHAK T.S., FARSTVEDT E., OTHIC A. Update on wound dressings: Indications and best use. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2004; 3 (2): 148-163.
- [15] SODERBERG K.A., PAYNE G.W., SATO A., MEDZHITOV R., SEGAL S.S., IWASAKI A. Innate control of adaptive immunity via regulation of lymph node feed arteriole. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 (45):16315-20.
- [16] WEI S.H., PARKER I., MILLER M.J., CAHALAN M.D. Una vista estocásticos de la motilidad y el tráfico de linfocitos en el ganglio linfático. *Immunol Rev* 2003, 195:136-159.
- [17] QI H., EGEN J.G., HUANG A.Y.C., GERMAIN R.N. Extrafoliculares activación de los ganglios linfáticos por las células B portadoras del antígeno Células dendríticas. *Ciencia*. 2006; 312(5780):1672-1676.
- [18] RATLIFF, C.R. Wound exudate: an influential factor in healing. *Adv Nurse Pract* . 2008; 16, 32-35; quiz 36.
- [19] HOLLE G., GERMANN G., SAUERBIER M., RIEDEL K., VON GREGORY H., PELZER M. Vacuum-assisted closure therapy and wound coverage in soft tissue injury. *Clinical use. Unfallchirurg*. 2007 abril; 110 (4): 289-300.
- [20] WEBB L.X. New techniques in wound management: vacuum-assisted wound closure. *J Am Acad Orthop Surg*. 2002; 10, 303-311.
- [21] LÓPEZ, N., CERVERO, S., JIMÉNEZ, M. J., SÁNCHEZ, J. F. (2014). Cellular characterization of wound exudate as a predictor of wound healing phases. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, 26(4), 101– 107.
- [22] DOERSCH K.M., DELLOSTRITTO D.J., NEWELL-ROGERS M.K. The contribution of interleukin-2 to effective wound healing. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(4):384-396.
- [23] WYFFELS J.T., BROGAN M.S., FRIES K.M. Analysis of the proteomic profile of chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen*. 2012; 20(3): 378- 401.
- [24] CERVERÓ-FERRAGUT S., LÓPEZ-RIQUELME N., MARTÍN-TOMÁS E., MASSA-DOMÍNGUEZ B., POMARES-VICENTE J., SOLER-PÉREZ M., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ J.F. Quantitative analysis of blood cells and inflammatory factors in wounds. *J Wound Care*, 2017;26:121-5.
- [25] PLEAT JM, HEBESTREIT HF, DWEK RA. Identifying protein production in wound healing: current techniques. *J Wound Care*. 2002; 11(2): 63- 66.