

Uso de Lisado de Plaquetas como terapéutica de una herida desgarrada en un caballo Silla Argentino

Santiago José Losinno^{1*}, Javier Aguilar², Patricia Bertone¹, Macarena Ferrario¹, Esteban Ferniot¹, Eugenia Baccani¹

1- Departamento de Clínica Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

2- Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Palabras clave

equino
herida
cicatrización
Lisado de Plaquetas
terapia regenerativa

Resumen. La medicina regenerativa es una de las terapias más prometedoras en la cicatrización de heridas. El Lisado de Plaquetas (LP) es rico en proteínas bioactivas y factores de crecimiento que promueven la regeneración de tejidos. El objetivo de este trabajo es reportar un caso de una amplia herida cutánea en una región sujeta a gran movimiento en un equino y su evolución con la aplicación de LP para el tratamiento. Se observó en una yegua raza Silla Argentino, 3 años de edad, una herida desgarrada con gran pérdida de piel en la región de brazo del miembro anterior izquierdo. Se realizó la restauración quirúrgica de la lesión, previa sedación con el animal de pie. Luego de 48 horas presentó dehiscencia de la sutura, por lo que se empleó un segundo tratamiento con LP autólogo aplicado en forma de spray sobre la herida. Se realizó registro fotográfico y mediciones de la herida cada 10 días, que evidenciaron reducción de tamaño hasta su completa cicatrización a los 116 días. Durante la terapia no se observaron complicaciones clínicas locales ni sistémicas. En este caso resultó una alternativa terapéutica práctica y favorable en el manejo de herida en caballos a campo.

Citar como: Losinno, S., Aguilar, J., Bertone, P., Ferrario, M., Ferniot E. y Baccani, E. (2020). Uso Lisado de Plaquetas como terapéutica de una herida desgarrada en un caballo Silla Argentino . Revista Científica FAV-UNRC *Ab Intus* 5(3) 88-93

Recibido: 31/4/2020 Aceptado: 16/6/2020

***Autor para correspondencia:** Santiago José Losinno, E-Mail slosinno@ayv.unrc.edu.ar. Ruta Nacional 36, Km. 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Platelet lysate as a treatment for a torn wound in an Argentine saddle horse

Key words

equine
wound
scarring
Platelet Lysate
regenerative therapy

Abstract. Regenerative medicine is one of the most promising therapies in wound healing. Platelet Lysate (LP) is rich in bioactive proteins and growth factors that promote tissue regeneration. The objective of this work is to report a case of a wide skin wound in a region subject to great movement in an equine and its evolution with the application of LP for treatment. A 3 years old Silla Argentino breed mare was observed a torn wound with great skin loss in the region of the arm of the left forelimb. Surgical restoration of the lesion was performed after sedation with the standing animal. After 48 hours, he presented dehiscence of the suture, so a second treatment with autologous LP applied in the form of a spray on the wound was used. A photographic record and measurements of the wound were made every 10 days, which showed a reduction in size until complete healing at 116 days. During therapy, no local or systemic clinical complications were observed. In this case, it was a practical and favorable therapeutic alternative in the management of wounds in field horses.

Las heridas en caballos son causa relativamente frecuente de consulta debido a su temperamento, ambiente, actividad deportiva y conformación anatómica de los miembros se incrementan las posibilidades de sufrir lesiones traumáticas (Iacopetti *et al.*, 2012). En general, las heridas del caballo con un tratamiento adecuado tienen buen

pronóstico. Sin embargo, las heridas lacerantes en los miembros y en las regiones anatómicas sujetas a alto movimiento están muy predispuestas a sufrir complicaciones tales como secuelas morfológicas o funcionales de la(s) extremidad(es) afectada(s). La cicatrización requiere mayor tiempo de recuperación, lo que conduce al desarrollo de cicatrización crónica con formación de tejido de granulación exuberante (Everts, 2007). Por lo tanto, el tratamiento implementado depende de la localización de la lesión, tamaño de la herida, tensión y movilidad de los márgenes de la misma, localización, presencia o ausencia de secreción, tipo y condición de tejido circundante (Everts, 2007; Iacopetti *et al.*, 2012).

El papel de las plaquetas en la cicatrización de las heridas ha permitido, su uso terapéutico como fuente natural de factores de crecimiento y otras proteínas que estimulan la cicatrización y disminuyen la inflamación de los tejidos afectados. Varios estudios sobre el uso de concentrados de plaquetas, o sus hemoderivados, demostraron reducción en la infla-

mación, mejoras en la regeneración y reducción en el tiempo de cicatrización de heridas (Mazzucco *et al.*, 2004; Pietramaggiori *et al.*, 2005; Nurden *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2009; Radziwon-Balicka *et al.*, 2012).

El Plasma rico en plaquetas (PRP), es una suspensión de plaquetas en plasma que se obtiene por la centrifugación de la sangre, posee distintas formas de preparación y activación según la metodología empleada. El PRP puede activarse farmacológicamente o ser activado naturalmente mediante el contacto con los tejidos para liberar sus factores de crecimiento y manifestar sus propiedades regenerativas. Varios reactivos, incluyendo trombina, calcio y colágeno tipo I, se aplican para liberar sus ingredientes activos (Pietramaggiori *et al.*, 2005; Reinisch *et al.*, 2007; Pawitan, 2012; Moreira Teixeira *et al.*, 2012; Mageed *et al.*, 2015). Adicionalmente, los factores de crecimiento también pueden ser liberados mediante cambios de temperatura con ciclos de congelación y descongelación del PRP que da lugar al desarrollo de un hemoderivado conocido como lisado de plaquetas (LP).

El LP contiene factores de crecimiento y citocinas disponibles de inmediato que promueven la regeneración de tejidos (Saldalamacchia *et al.*, 2007; Pawitan, 2012). Diversos trabajos sobre concentrados plaquetarios en el tratamiento de heridas y con-

diciones musculoesqueléticas crónicas en caballos, señalan resultados alentadores en el proceso de cicatrización de heridas en diferentes tejidos, incluyendo cartílago, tendones, ligamentos, hueso y piel (Carmona *et al.*, 2006). En este sentido, el objetivo de este trabajo es reportar un caso de un caballo con una gran herida cutánea lacerada, en una región sujeta a gran movimiento en el brazo, el cual fue tratado exitosamente con un LP.

Presentación del caso

El caso refiere a una yegua raza Silla Argentino de, 3 años de edad. Durante la inspección general se constató una herida desgarrada en la región de brazo, correspondiente al miembro anterior izquierdo, de longitud proximodistal de 22 cm y cráneocaudal de 13 cm, la cual se extendía 5 cm distal a la articulación del hombro hasta el tercio distal del húmero, involucrando más del 50% de la circunferencia del brazo izquierdo, sin afección de las articulaciones en la región comprometida. La lesión produjo una claudicación grado 2 de 5, según clasificación American Association of Equine Practitioners (AAEP). La lesión afectaba piel y tejido subcutáneo con secreción serosanguinolenta, no se vieron involucrados los músculos deltoides y tríceps braquial. Al examen externo se observaron signos clínicos de inflamación local en la periferia de la lesión correspondiente al trauma producido. No se encontraron cuerpos extraños en la herida ni alteraciones relevantes en la inspección general. No se efectuaron exámenes complementarios.

Manejo terapéutico

El primer día de tratamiento, luego de la antisepsia de la herida con jabón neutro y solución salina, se optó por un abordaje quirúrgico. Se le administro Xilazina al 10% 1,1 mg / kg por vía intravenosa, (Xylazina 10%, Clínica Equina, Argentina), para suturar la herida en sedación permanente. Se aplicó lidocaína clorhidrato al 2%, 20 ml totales, (Lidocaine, Richmond Vet Pharma, Argentina) como anestésico local subcutáneo. Los bordes de la herida fueron desbridados y suturados con Vicryl Plus 0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Roma, Italia), mediante puntos discontinuos. No se colocaron tubos de drenaje ni vendajes para cubrir la herida después del procedimiento. Se administró Penicilina, 10.000 U.I / kg (Tri-

fect Forte, Over, Argentina) vía intramuscular, cada 24 horas durante 5 días. Por otro lado, se administró Ivermectina al 1,87%, 200 mcg / kg, vía oral (Eqvalan, Merial, Argentina). Luego de 48 h se produjo la dehiscencia de la sutura, exponiéndose la capa muscular.

Tras el fracaso del primer procedimiento, se continuó con tratamiento médico y se inició una segunda terapia local mediante extracción del colgajo y cicatrización por segunda intención con la aplicación tópica de un LP autólogo en forma de spray, cada 48 horas (Figura 1).



Figura 1. Herida después del fracaso de la sutura, previa limpieza y retiro del colgajo.

Preparación del lisado de plaquetas

El LP, se obtuvo luego de extraer sangre periférica del paciente en condiciones de asepsia por venipunción yugular izquierda con aguja 18G, conservadas en bolsa para extracción de sangre de 500 ml cada una, con anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa-adenina

(CPDA-1) y una segunda extracción 15 días después. La muestra de sangre se centrifugó inicialmente a 270 G durante 7 minutos (GELEC G-142-D, Argentina), de este modo se separó en el fondo del tubo las células rojas, por encima los glóbulos blancos y en el sobrenadante el plasma concentrado en plaquetas que se transfirió a un segundo tubo y se centrifugó nuevamente a 1000 G durante 5 minutos. Luego de la segunda separación, el plasma sobrenadante se descartó quedando un volumen de LP equivalente al 10% de la sangre total inicial. Las muestras de LP se

almacenaron en tubos Eppendorf de 2 ml y fueron congeladas a -20°C hasta el momento de su utilización. Todo el manejo de las muestras se realizó bajo una campana de flujo laminar.

La activación del LP se realizó al momento de su utilización, el LP fue descongelado a baño maría (37°C aproximadamente) y se colocó en un tubo estéril de polipropileno de tipo Falcon (15 ml), al cual se le adaptó un pulverizador manual, previo empaquetado y esterilización con óxido de etileno (Figura 2).



Figura 2. A. Materiales estériles para la aplicación de LP. B. LP activado en aspersor manual para su aplicación directa sobre la herida



Figura 3. A y B. Herida 48 horas después del retiro del colgajo; Primera aplicación de LP; C. 18 días luego de iniciado el tratamiento con LP; D. 42 días posteriores al inicio de la terapia con LP; E. 77 días de evolución del tratamiento con LP; F. 116 días posteriores al inicio del tratamiento, obsérvese una pequeña cicatriz con crecimiento de pelo.

Evaluación del tratamiento con el lisado de plaquetas

Se tomaron mediciones de la lesión cada 10 días, las mismas fueron realizadas utilizando sistema métrico convencional, se midió en cm la distancia entre los bordes craneocaudal y ventrodorsal, permitiendo evaluar la evolución de la herida con sucesivas aplicaciones de LP.

Cada día de tratamiento se realizó la limpieza de la herida con solución salina, luego se aplicó el LP directamente sobre la misma en forma de aspersión. El volumen de solución aplicada inicialmente fue de 10 ml, luego de las primeras 4 aplicaciones, el volumen de LP se disminuyó a 5 ml.

Al día 8 de tratamiento, para determinar la tasa de cierre de la herida, se realizó la medición de la misma registrándose reducción de tamaño respecto a la medida inicial al comienzo de la terapia, se observó disminución gradual de la inflamación (Tabla 1).

DIAS	LONGITUD PROXIMODISTAL (cm)	LONGITUD CRANEOCAUDAL (cm)
0	22	13
8	19	11
18	17	7
32	16	5
42	15	5
53	14	4
65	13	3,5
77	12	3
91	12	2
116	0	0

Tabla 1. Velocidad de cicatrización de la herida (tiempo). Tomando el día 0 como el inicio del tratamiento.

Por otro lado, se tomaron fotografías digitales para registrar dicho proceso. Luego de 65 días de iniciada la terapéutica, se constató una reducción del 50% de la lesión inicial y la resolución total de la herida se completó a los 116 días (Figura 3).

No se encontraron reacciones de tipo proliferativa exuberante en los bordes o dentro de la herida. No se observaron complicaciones clínicas locales ni sistémicas, durante o después del tratamiento.

Los resultados clínicos revelaron que la formulación de LP utilizada aceleró el proceso de curación de la herida tratada, con aumento del tejido de granulación, mayor contracción de los bordes de la misma, sin observación de complicaciones descriptas para este tipo de herida en caballos.

En las últimas décadas, se han incrementado reportes experimentales y clínicos, que respaldan los resultados de preparaciones ricas en plaquetas mediante estimulación y aceleración en la cicatrización de los tejidos blandos (Mazzucco *et al.*, 2004; Pietramaggiore *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2006; Nurden *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2009). La aplicación tópica de LP como herramienta terapéutica de heridas de gran extensión, disminuye la inflamación y reduce los tiempos de cicatrización sin complicaciones, hallazgo que coincide con estudios previos, dado que el uso de hemoderivados plaquetarios, como fuente natural de factores de crecimiento, promueve el reclutamiento celular, remodelación de la matriz, angiogénesis y maduración de vasos sanguíneos (Carmona *et al.*, 2006; Nurden *et al.*, 2011; Radziwon-Balicka *et al.*, 2012).

La utilización clínica de hemoderivados plaquetarios, requiere previa activación para manifestar sus propiedades regenerativas (Moreira Teixeira *et al.*, 2012). En el presente estudio, se utilizó el método de congelación y descongelación para liberar sus ingredientes activos y promover la regeneración de tejidos (Pawitan, 2012; Reinisch *et al.*, 2007).

Tal como ha sido reportado por diversos autores, heridas distales en los miembros y regiones anatómicas sujetas a movimiento, la cicatrización requiere mayores tiempos de recuperación, predisponiendo en caballos a heridas crónicas o formación de tejido de granulación exuberante (Iacopetti *et al.*, 2012; Everts, 2007). En este sentido, el uso de LP, mediante aplicación local, aceleró el mecanismo fisiológico de curación, estimulando el proceso de reparación normal sin complicaciones ni formación de tejido exuberante, y redujo el tiempo de recuperación del animal (Saldalamacchia *et al.*, 2007; Pawitan, 2012).

En cuanto a la evolución clínica, la restauración completa de la herida, se observó 4 meses posterior a la aplicación inicial de LP. La evaluación del proceso se realizó mediante mediciones de los márgenes de la lesión y registros fotográficos, infiriendo que la utilización de LP como terapia adicional puede mejorar

la cicatrización del tejido considerando la extensión de la herida inicial y la posición anatómica (Everts, 2007; Iacopetti *et al.*, 2012).

La utilización de este método de conservación de LP para el tratamiento de heridas posee la característica de fácil almacenamiento y traslado. Estudios previos muestran que un almacenamiento a -20°C durante 2 meses no produce efectos perjudiciales en la calidad de los hemoderivados plaquetarios (Mageed *et al.*, 2015). En nuestro caso se utilizó a campo mediante aplicación en spray, mientras que Saldalamacchia *et al.* (2004) sugieren aplicación local en forma de gel en heridas complejas, demostrando resultados positivos.

Por lo tanto, se puede concluir que la aplicación de LP en forma tópica a través de spray podría tener un efecto sinérgico en el proceso de cicatrización de heridas en caballos. Se recomienda mayor investigación de la eficacia de LP autólogo congelado en ensayos clínicos mayores, para confirmar los buenos resultados observados en este caso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carmona. Jorge. U. (2006). Use of autologous platelet concentrates of the treatment of musculoskeletal injuries in the horse. Spain: Autonomous University of Barcelona. Thesis of Doctorate in Veterinary Medicine.
- Everts. P. A. (2007). Autologous platelet-leucocyte enriched gel basics and efficacy: a novel method to support soft tissue and bone healing. Netherlands: Catharina Hospital Eindhoven. PhD thesis.
- Foster. T.E., Puskas. B.L., Mandelbaum. B.R., Gerhardt. M.B., Rodeo. S.A. (2009). Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *American Journal of Sports Medicine*. 37: 2259-72.
- Iacopetti, I., Perazzi, A., Ferrari, V., Busetto, R. (2012). Application of platelet-rich gel to enhance wound healing in the horse: a case report. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32: 123-8.
- Mageed, M., Ionita, C., Kissich, C., Brehm, W., Winter, K., Ionita. J.C. (2015). Influence of cryopreservation and mechanical stimulation on equine Autologous Conditioned Plasma (ACP). *Tierärztliche Praxis*. 43: 97-104.
- Mazzucco, L., Medici, D., Serra, M., Panizza, R., Rivara, G., Orecchia, S., Libener, R., Cattana, E., Levis, A., Betta. P.G., Borzini, P. (2004). The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide. Transfusion Journal*. 44: 1013-1018.
- Moreira Teixeira. L.S., Leijten. J.C.H., Wennink. J.W.H., Chatterjea. A.G., Feijen, J., Van Blitterswijk. C.A., Dijkstra. P.J., Karperien, M. (2012). The effect of platelet lysate supplementation of a dextran-based hydrogel on cartilage formation. *Journal Biomaterials*. 33: 3651-61.
- Nurden. A.T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I., Anitua, E. (2008). Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience*. 13: 3532-48.
- Pawitan. J.A. (2012). Platelet rich plasma in xeno-free stem cell culture: the impact of platelet count and processing method. *Current Stem Cell Research & Therapy* 7: 329-335.
- Pietramaggiori, G., Kaipainen, A., Czezug. J.M., Wagner. C.T., Orgill. D.P. (2006). Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*. 14: 573-80.
- Radziwon-Balicka, A., Moncada de la Rosa, C., Jurasz, P. (2012). Platelet associated angiogenesis regulating factors: a pharmacological perspective. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology* 90: 679-688.
- Reinisch, A., Bartmann, C., Rohde, E., Schallmoser, K., Bjelic-Radisic, V., Lanzer, G., Linkesch, W., Strunk, D. (2007). Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regenerative Medicine* 2: 371-382.
- Saldalamacchia, G., Lapice, E., Cuomo, V., De Feo. M.E., D'Agostino, E., Rivelles. A.A., Riccardi, G., Vaccaro, O. (2004). Uso del gel di piastrine autologo per la cura delle ulcere del piede diabetico. *Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo*. 24: 103-5.