

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**TERAPIA REGENERATIVA APLICANDO
PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y PARCHES DE FIBRINA EN CASOS
CLÍNICOS DE HERIDAS CUTANEAS EN CANINOS**

por

Karol CUÑA

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección,
Control y Tecnología de los Alimentos
de Origen Animal.

MODALIDAD: Estudio de Caso

**MONTEVIDEO, URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

nombre completo y firma

Segundo miembro (Tutor):

nombre completo y firma

Tercer miembro:

nombre completo y firma

Fecha:

Autor:

nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

En especial, a mi tutora Dra. María del Carmen Cuns por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su enseñanza continua, tiempo y dedicación brindada para que este estudio saliera adelante y sobre todo por su gran capacidad ejecutiva.

A mis co-tutores, Dra. Jacqueline Maisonnave y Dr. Kevin Yaneselli por el material brindado y su ayuda en el procesamiento de los datos obtenidos, pero sobre todo por el apoyo y disponibilidad en todo el estudio.

Al Dr. Martino y a su equipo de análisis clínicos por el apoyo constante.

A todo el equipo del sector de rehabilitación canina, en especial a Stella Da Silva por haberme brindado casos para el estudio y además, por la dedicación y gran ayuda.

A todo el personal del hospital de Facultad de Veterinaria, UdelaR por su ayuda en el trabajo y por el interés que le pusieron a este estudio.

A mis amigos y todo aquel que de una u otra manera contribuyó a la realización de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a mis padres, Mirian y Algenor y a mis hermanos por la comprensión, paciencia y el ánimo brindado.

TABLA DE CONTENIDOS

	2
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
TABLA DE CONTENIDOS.....	6
LISTA DE CUADROS Y TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	10
SUMMARY.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
Heridas.....	11
Concepto.....	12
Clasificación.....	14
Fases de la cicatrización.....	16
Tipos de cicatrización.....	17
Complicaciones.....	18
Tratamientos tradicionales.....	18
Factores que alteran la cicatrización.....	19
Sangre.....	19
Definición.....	20
Recuento celular automático.....	20
Recuento celular manual.....	20
Número de plaquetas.....	21
Errores en mediciones.....	21
Hemostasia.....	23
Anticoagulantes.....	24
Plaquetas.....	24
Génesis y funciones.....	25
Membrana de las plaquetas y sus receptores.....	26
Citoplasma y granulos.....	27
Respuesta plaquetaria.....	28
Medicina regenerativa.....	28
Plasma rico em plaquetas.....	31
Factores de crecimiento.....	33
Parches de fibrina.....	34
Usos de parches de fibrina en terapia regenerativa..	34
OBJETIVOS.....	35
HIPÓTESIS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
RESULTADOS.....	51
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	55

ANEXOS

Anexo 1..... 59
Anexo 2..... 61
Anexo 3..... 65

LISTA DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1: Anticoagulantes.....	23
Cuadro 2: Factores de crecimiento contenidos en los gránulos α de las PLT y sus receptores.....	31
Cuadro 3: Resultados obtenidos de caso 1.....	39
Cuadro 4: Resultados obtenidos de caso 2.....	40
Cuadro 5: Resultados obtenidos de caso 3.....	41
Cuadro 6: Cuadro de datos del caso 4.....	42
Cuadro 7: Cuadro de datos del caso 5.....	43
Cuadro 8: Cuadro de datos del caso 6.....	44
Cuadro 9: Medidas del área y perímetro de los casos.....	47
Cuadro 10: Tasa de contracción.....	47
Tabla 1: Distribución de las muestras por edad y peso tomadas en cuenta en el estudio.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de la cicatrización de heridas en piel.....	14
Figura 2: Curación por primera intención y segunda intención.....	17
Figura 3: Diferencias físicas entre el plasma y el suero. (A) Mezcla de células y plasma en la sangre entera.....	19
Figura 4: Hemostasia.....	21
Figura 5: Ilustración de la hemostasia primaria.....	22
Figura 6: Origen de las plaquetas.....	25
Figura 7: Ilustración de estructura de la plaqueta.....	27
Figura 8: Diagrama esquemático del proceso de curación de las heridas en condiciones normales y de su aceleración cuando se aplica el preparado plasmático rico en PLT.....	29
Figura 9: Preparación de Plasma, PRP, PPP.....	30
Figura 10: Resultados del relevamiento de casos clínicos.....	37
Figura 11: Reducción de la herida del caso 1.....	39
Figura 12: Reducción de la herida del caso 2.....	40
Figura 13: Reducción de la herida del caso 3.....	41
Figura 14: Reducción de la herida del caso 4.....	42
Figura 15: Reducción de la herida del caso 5.....	43
Figura 16: Reducción de la herida del caso 6.....	44
Figura 17: Reducción de la herida del caso 7.....	45
Figura 18: Reducción de la herida del caso 8.....	46
Figura 19: Ubicación anatómica de la lesión en cada caso clínico.....	46
Figura 20: Tasa de contracción (TC %) de los casos clínicos.....	49

Figura 21: Análisis microbiológico.....

51

RESUMEN

El plasma rico en plaquetas (PRP) es una fuente de factores de crecimiento (FC) que, junto a geles de fibrina o parches de fibrina (PF) son muy importantes para la aceleración de la reparación y regeneración de los tejidos lesionados debido a la producción de colágeno, al estímulo de la proliferación celular, a la diferenciación celular y a la angiogénesis. El objetivo del presente trabajo de estudio fue evaluar el tratamiento con PRP y PF autólogos (grupo medicina regenerativa), y comparar la demora en el tiempo de la cicatrización con casos clínicos control (grupo control), los cuales fueron tratados únicamente con tratamiento tradicional. También se realizó un estudio retrospectivo de 3 años de lesiones de piel en *Canis familiaris*. El PRP y PF se obtuvo de la doble centrifugación de la sangre periférica extraída de los ejemplares que eran mayores de 1 año de edad con un peso igual o superior a 5kg y sin distinción de sexo. Se realizaron aplicaciones semanales de PRP perilesional a nivel intradérmico y PF en la superficie de la lesión mediante parches con gasa estéril, durante 3 a 4 semanas. Se observó la evolución de la cicatrización del paciente, llevando un registro escrito y fotográfico del mismo. Se comprobó clínicamente y mediante el uso del programa ImageJ que hubo una aceleración en la cicatrización de las heridas de los casos clínicos y fue segura su aplicación, no evidenciándose signos de rechazo ni inflamación. En el estudio retrospectivo se comprobó que existieron en 3 años pocas lesiones de piel. Las características del PRP y PF los convierten en opciones prometedoras para ser utilizadas en medicina regenerativa veterinaria.

PALABRAS CLAVES: plasma rico en plaquetas, parches de fibrina, cicatrización de heridas.

SUMMARY

Platelet-rich plasma (PRP) is a source of growth factors (FC), which, together with fibrin gels or fibrin patches (PF), are very important for the acceleration of repair and regeneration of injured tissues due to production of collagen, stimulation of cell proliferation, cell differentiation and angiogenesis. The objective of the present study was to evaluate the treatment with PRP and autologous PF (regenerative medicine group), and to compare the time delay of healing with clinical control cases (control group), which were treated only with traditional treatment. A retrospective 3-year study of skin lesions in *Canis familiaris* was also performed. The PRP and PF were obtained from the double centrifugation of the peripheral blood extracted from the individuals that were older than 1 year of age with a weight equal to or greater than 5kg and without distinction of sex. Weekly applications of perilesional PRP at intradermal level and PF were performed on the surface of the lesion by patches with sterile gauze for 3 to 4 weeks. The evolution of the healing of the patient was observed, carrying a written and photographic record of the same. It was clinically proven and through the use of the ImageJ program that there was an acceleration in the healing of the wounds of the clinical cases and its application was safe, showing no signs of rejection or inflammation. In the retrospective study it was verified that there were few skin lesions in 3 years. The characteristics of PRP and PF make them promising options for use in veterinary regenerative medicine.

KEY WORDS: platelet-rich plasma, fibrin glue, wounds healing

INTRODUCCIÓN

Las heridas y sus complicaciones representan un número poco frecuente de casos en la clínica veterinaria corriente, siendo la mayoría de fácil resolución (Juncosa y col., 2009). Según un relevamiento de casos del Hospital de la Facultad de Veterinaria de UdelaR y veterinarias privadas, previo al comienzo de estudio de casos propiamente dicho, las causas más habituales se relacionan con traumatismos tales como accidentes de tránsito, golpes y caídas. Los avances científicos, han motivado a estudiar terapias alternativas para tratar estas complicaciones cutáneas, como son plasma rico en plaquetas (PRP) y parches de fibrina (PF), los cuales han tenido resultados prometedores en medicina veterinaria (Pelagalli y col., 2003; Paes-Leme y col., 2006; Hermeto, 2010; Textor y col., 2013; Merlini y col., 2014). Se han utilizado en injertos cutáneos en conejos (Vendramin y col., 2001), en reparaciones dérmicas en ratas (Bauer y col., 2009), en heridas de equinos (Mondino y col., 2016). Además, se ha demostrado que los PF poseen utilidades en procesos quirúrgicos como hemostasia, cicatrización, soporte en sutura, adhesividad del tejido (Mankad, 2001). Schumacher y col. (1996), estudiaron el uso de PF en injertos cutáneos en heridas de equinos los cuales fueron exitosos. En un modelo experimental, Scalfani y col. (2005), evaluaron el uso de PRP en cicatrización cutánea en conejos. Wilson y col. (2006) utilizaron PRP en lesiones óseas las cuales cicatrizaron más rápido que las que no fueron tratadas. Kim y col. (2009) usaron PRP en una extensa herida cutánea de perro. Mondino y col. (2016), aplicaron exitosamente PRP sobre una fractura de tercer carpiano del miembro anterior derecho y PF en una herida en la región metatarsiana del miembro posterior izquierdo de un equino deportivo. Según, Tridick y Warner (1994), el uso de fibrina artificial en lesiones humanas puede mejorar el soporte mecánico en tejidos y al mismo tiempo promover la aceleración de la cicatrización. Sánchez y col. (2003), documentaron un caso de avulsión cartilaginosa no traumática en un futbolista con resolución favorable mediante el uso de PRP. En el futuro, el uso de fibrina será importante en ingeniería de tejidos, permitiendo una mejor resolución de quemaduras con resultados cosméticos aceptables (Currie y col., 2001).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. HERIDAS

1.1 CONCEPTO HERIDA

Una herida es una interrupción de la integridad anatómica, fisiológica y funcional del tegumento, piel y mucosas (Juncosa y col., 2009 adaptado). Es una solución

de continuidad de los tejidos blandos (Pavletic, 2011). Se considera que la etiología es un agente físico de tipo mecánico. Los signos y síntomas son dolor, hemorragia, separación de los bordes, inflamación. La gravedad de las mismas depende de su extensión, profundidad, órganos comprometidos, zona afectada, grado de limpieza y presencia o no de cuerpos extraños (Juncosa y col., 2009).

La cicatrización de las heridas requiere un complejo balance entre elementos de la matriz y FC, también de la sangre, tamaño, tensión, movilidad, infección, tipo y condición del tejido subyacente (Kim y col., 2009).

1.2 CLASIFICACIÓN

De acuerdo con Juncosa y col. (2009), las heridas se clasifican según la contaminación microbiana (CM) en: limpias, limpias-contaminadas, contaminadas y sucias-contaminadas; según complejidad (C) en: simples o complicadas; según el agente etiológico (AE) en: contusas, incisas, punzantes, inciso-punzantes, lacerantes y mordeduras; y según su presentación (P) en: abrasivas, netas, en bisel, con pérdida de tejido o sustancia, en colgajo, mutilantes, complejas. Stashak (1994), las clasifica según el tipo de cicatrización (TC) en: cierre por primera intención, cierre por segunda intención y cierre por primera demorada. En este estudio, no consideramos a las quemaduras como heridas, dado que el agente causal no es mecánico.

1.2.1 CLASIFICACIÓN MICROBIANA

- a) **Limpias:** no están infectadas, no hay inflamación, ocurrieron en un tiempo menor a seis horas y presentan la zona limpia. Son heridas de cirugía por lo que ocurre el cierre por primera intención.
- b) **Limpias-contaminadas:** implica contacto con la flora normal del tracto respiratorio, digestivo, génito-urinario.
- c) **Contaminadas:** están infectadas y frescas, hay signos de inflamación aguda no purulenta, ocurridas en un tiempo superior a 6 horas y comprometen el tracto respiratorio, digestivo y génito-urinario.
- d) **Sucias-infectadas:** cuando el número de bacterias supera 10⁵ microorganismos por gramo de tejido se considera infectada y no contaminada. La infección dificulta la cicatrización.

Cabe resaltar que, en medicina veterinaria, todas las heridas, excepto las quirúrgicas, se consideran contaminadas, es decir que existe la presencia de micro-organismos, aunque estos no se han comenzado a multiplicar, lo que las transformaría en infectadas. (comunicación personal, Depto. Equinos)

1.2.2 COMPLEJIDAD

- a) **Simple:** compromete piel o músculo, sin tener mayor profundidad.

b) **Complicadas:** son extensas y profundas con hemorragia abundante, comprometen músculos, tendones, nervios, vasos sanguíneos, órganos internos. Pueden ser perforantes y/o penetrantes comprometiendo compartimentos anatómicos o transfixiones cuando supera el músculo y comunica dos cavidades distintas.

1.2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

a) **Contusas:** producidas por objetos duros, sin filo y con bordes romos. La lesión es estrellada e irregular. Hay dolor y formación de hematomas.

b) **Cortantes o incisas:** producidas por objetos filosos pudiendo comprometer músculos, tendones y nervios. Los bordes de la herida son limpios y lineales, la hemorragia puede ser escasa o abundante.

c) **Punzantes:** producidas por objetos con punta sin filo. La lesión es dolorosa y la hemorragia es escasa. Son peligrosas porque pueden ser profundas, perforar vísceras y provocar hemorragias internas. Su mayor gravedad, es la probabilidad de contaminación con microorganismos del grupo de los anaerobios (*Clostridium*), en particular el *Clostridium tetani*¹.

d) **Inciso-punzantes:** provocadas por objetos agudos y afilados como tijeras, cuchillos o hueso fracturado.

e) **Lacerantes:** producidas por objetos de bordes dentados como serruchos o latas. Hay desgarramiento de tejidos y los bordes de heridas son irregulares.

f) **Mordeduras:** producidas por dentaduras, pudiendo ser puntiformes o desgarradas. Son heridas contaminadas o mayormente infectadas. Se recomienda antibioterapia sistemática.

1.2.4 PRESENTACIÓN

a) **Abrasivas:** se producen por fricción de una superficie dura e irregular sobre la piel. Tienen distintos grados de profundidad. Son contaminadas o infectadas que arrastran tierra y piedras.

b) **Netas:** tienen bordes regulares como incisiones quirúrgicas o heridas cortantes. Tienen bordes simétricos con el lado opuesto por lo que al afrontarlos coinciden. Buena cicatrización.

c) **Heridas en bisel:** heridas contusas de corte oblicuo con bordes irregulares de y no coincidentes. Se deben regularizar bordes para alinearlos y cicatrizar.

d) **Heridas con pérdida de tejido o sustancia:** heridas que han perdido parte importante de tejido por lo que no se pueden suturar.

e) **Heridas con colgajo:** la solución de continuidad compromete la piel, aponeurosis y músculos. La piel queda plegada sobre sí o adherida por un pedículo. Son irregulares y muchas veces con fondo de saco. En ocasiones

¹ Se les nombra como heridas tetanígenas.

necesitan plastias para su manejo.

f) **Mutilantes:** el agente traumático externo destroza la piel y demás tejidos, produciéndose la pérdida de una parte del mismo.

g) **Complejas:** afecta la piel, aponeurosis, músculos, tendones, nervios, vasos sanguíneos y huesos.

1.2.5 TIPO DE CICATRIZACIÓN

a) **Cierre por primera intención:** se observa en las heridas quirúrgicas y las heridas incisas (Stashak y Theoret, 2008). Se afrontan los tejidos con puntos con una mínima tensión y la menor cantidad posible de puntos (Stashak, 1994).

b) **Cierre por segunda intención:** en forma lenta y a expensas de un tejido de granulación, dejando una cicatriz antiestética que ocurre cuando hay pérdida de sustancia, dificultad para afrontar los bordes de una herida, presencia de cuerpos extraños o en un proceso infeccioso en la misma (Stashak, 1994; Guarín y col., 2013).

c) **Cierre por primera demorada:** es un método intermedio al que se denomina cicatrización primaria demorada en el cual se realiza la sutura de la herida previo a la formación del tejido de granulación, 4 a 5 días post injuria (Stashak, 1994).

1.3 FASES DE LA CICATRIZACIÓN

Según DeRossi (2009), la cicatrización de la herida es un fenómeno fisiológico que se inicia a partir de la pérdida de integridad de la piel generando una solución de continuidad que alcanza las capas subyacentes en diversos grados y depende de una serie de reacciones químicas y celulares, divididas clásicamente en etapas: inflamatoria y desbridamiento, proliferativa y remodelación o maduración (fig. 1) reguladas por células, citoquinas y FC (Stashak y Theoret, 2008; Flores y col., 2011; Cho-Hee y col., 2016).

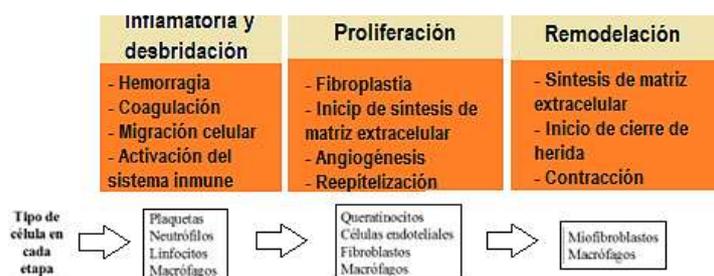


Figura 1: Etapas de la cicatrización de heridas en piel.

A. Etapa inflamatoria y desbridamiento

En respuesta al daño tisular y vascular, la etapa inflamatoria tiene como objetivo la activación plaquetaria seguida por la formación de un tapón plaquetario y un coágulo hemático con la consecución de la hemostasia y la secreción de proteínas biológicamente activas involucradas en el proceso de curación tisular (Flores y col., 2011a). Estas proteínas son los FC, básicamente secretados por plaquetas (PLT) (Flores y col., 2011b). Es por ello que, el uso de PRP ha mostrado una gran eficacia en el tratamiento de las heridas donde las PLT cumplen un rol muy importante por su función hemostática y la concentración natural de citoquinas y FC (Cho-Hee y col., 2016). Seguidamente, la etapa de desbridamiento tiene como objetivo la eliminación de cuerpos extraños y tejido necrótico (Stashak y Theoret, 2008). La hemostasia ocurre por una activación de la cascada de coagulación a través de vías extrínsecas e intrínsecas, llevando a la agregación de PLT y la formación de coágulo (Pool, 1977). Los neutrófilos predominan 24 a 36 horas después de la injuria, llegando al sitio de la lesión mediante migración y diapédesis (Robson y col., 2001) y eliminan material extraño, bacterias y células muertas (Scott y col., 2012) dando inicio a la etapa de desbridamiento. Los mastocitos también son activos y liberan gránulos que contienen enzimas, histamina y otras aminos activas que desencadenan la aparición de los signos característicos de inflamación alrededor del sitio de la herida: rubor, calor, tumor y dolor (Degreef, 1998). Después de 48 a 72 horas de ocurrida la lesión, aparecen los monocitos que siguen la fagocitosis (Hunt, 1988). Los macrófagos también actúan como reguladores clave de células y producen factor de necrosis tumoral ² (TNF), factor de crecimiento epidérmico ³ (EGF), y factor de crecimiento de fibroblastos ⁴ (FGF) que son importantes para la activación de los queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (Velnar y col., 2009).

A. Fase proliferativa

Empieza a partir del día 3 post lesión y dura aproximadamente 2 semanas. Se forma tejido de granulación, hay migración de fibroblastos y depósito extracelular de matriz recién sintetizada (Velnar y col., 2009). Se inicia la angiogénesis, estimulada por el factor de crecimiento endotelial vascular ⁵ (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico ⁶ (bFGF), y el factor de crecimiento transformante beta ⁷ (TGF- β) producidos por células epidérmicas, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales vasculares (Tonnesen y col., 2000). Una vez que los fibroblastos llegan a la herida, proliferan y comienzan a sintetizar una matriz provisional rica en colágeno bajo la influencia de varias citoquinas y FC.

² Del inglés: tumor necrosis growth factor (TNF);

³ Del inglés: epidermal growth factor (EGF);

⁴ Del inglés: fibroblast growth factor (FGF);

⁵ Del inglés: vascular endothelial growth factor (VEGF);

⁶ Del inglés: basic fibroblast growth factor (bFGF);

⁷ Del inglés: transforming growth factor beta (TGFB).

El TGF- β liberado previamente por PLT y macrófagos, es una señal crítica ya que aumenta la producción total de componentes de la matriz, incluyendo el colágeno, proteoglicanos y fibronectina (Stashak y Theoret, 2008). Al mismo tiempo, este factor disminuye la secreción de proteasas responsables de la ruptura de la matriz (Diegelmann y col., 2004). Durante la fase de proliferación, el proceso de epitelización es estimulado por la presencia de EGF que es producido por PLT y queratinocitos y de TGF- β que es producido por la activación de los macrófagos de la herida (Schultz, 1991).

B. Fase de remodelación

Es la última fase de la cicatrización pudiendo durar hasta 1, 2 o más años (Ramasastry, 2005). Resulta en el aumento del depósito y reorganización de las fibras de colágeno y aumento de la resistencia de la cicatriz (Baum y col., 2005 y Garcez, 2012). El tejido conectivo subyacente se contrae en tamaño y acerca los márgenes de la herida, regulado por FC derivado de PLT ⁸ (PDGF), TGF- β , y bFGF. A medida que la herida se repara, la densidad de los fibroblastos y macrófagos se reducen por apoptosis.

1.3 TIPOS DE CICATRIZACIÓN

La cicatriz es una masa de tejido conjuntivo esencialmente fibroso revestido por la epidermis neoformada que ocupa una antigua solución de continuidad producida por el traumatismo (aporte de cátedra de equinos).

Hay dos tipos de cicatrización principal, cicatrización primaria (o por primera intención) y la cicatrización por segunda intención (fig. 2). La primera se observa en las heridas quirúrgicas y las heridas incisas. La segunda ocurre en forma lenta y a expensas de un tejido de granulación, dejando una cicatriz antiestética que ocurre cuando hay pérdida de sustancia o dificultad para afrontar los bordes de una herida o en un proceso infeccioso en la misma (Guarín y col., 2013). Muchas veces se procede a permitir la cicatrización por un método intermedio al que se denomina cicatrización primaria demorada (Stashak, 1994). Asimismo, la cicatrización de heridas puede verse alterada por hiperadrenocorticismos, diabetes mellitus, desórdenes hepáticos, uremia, tratamiento con quimioterápicos u otra patología (Cho-Hee y col., 2016).

⁸ Del inglés: platelet derived growth factor (PDGF).

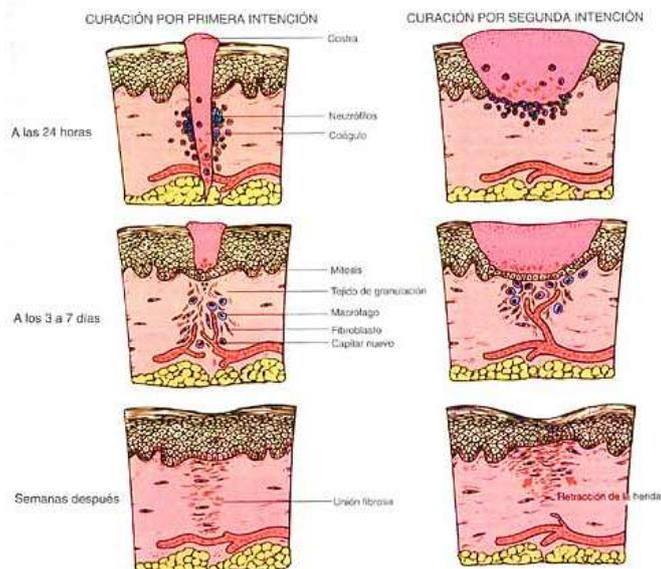


Figura 2: Curación por primera intención a la izquierda y segunda intención.
 Extraído de www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo5/tema04_regeneracion/010curacion.htm

1.4 COMPLICACIONES DE HERIDAS

Según Sopena (2009), las principales complicaciones en la cicatrización de heridas son:

- 1) **Seroma:** es la acumulación o colección de suero o líquido linfático localizado en un espacio virtual del cuerpo proveniente de necrosis de grasa secundaria a traumatismo o mal manejo quirúrgico, sección de vasos linfáticos y otros.
- 2) **Hematoma:** es la acumulación de sangre proveniente de traumatismos, hemostasia deficiente o trastornos de la coagulación.
- 3) **Absceso:** es la colección circunscrita de pus proveniente de traumas (tejidos necróticos) o proliferación bacteriana. Se localizan en tegumentos, órganos y cavidades.
- 4) **Infección:** son heridas con un agente infeccioso multiplicándose en su superficie. La infección retrasa la cicatrización debido a que las bacterias degradan colágeno, además el pH disminuye, hay déficit de oxígeno e interferencia mecánica del exudado.
- 5) **Celulitis:** infección invasiva del tejido celular subcutáneo, generalmente debido a estreptococos. Puede invadir sistema linfático causando linfangitis. Se observa edema y signos de inflamación.
- 6) **Gangrena gaseosa:** infección del tejido muscular causando toxemia con formación de gas y clínicamente, presencia a la palpación, de crepitación.

Generalmente es causada por clostridios. Hay dolor, edema en las primeras 24hrs con exudado acuoso, pardo y olor pútrido con burbujas de aire.

- 7) Dehiscencia:** es la separación de planos anatómicos previamente suturados de una herida. Puede ser muy grave en caso de suturas en pared abdominal. A nivel de línea media puede producirse eventración cuando las vísceras están cubiertas por piel y peritoneo; y evisceración cuando la separación de los planos es completa, abarcando la piel y las vísceras se exponen al medio externo.

1.5 TRATAMIENTOS TRADICIONALES

Primeramente, para evitar contaminación extra de la herida, se debe proteger la zona de la lesión con gasa embebida en suero, rasurar ampliamente desde los bordes, seguir por un lavado con solución salina y aplicación de lidocaína (en caso de ser necesario para el mejor manejo del paciente). Posteriormente, se hace un segundo lavado antiséptico con solución salina a la que se adiciona povidona yodada ⁹ 0,1 a 0,2% (1 a 2mL de povidona yodada en 1000mL de salina) o diacetato de clorhexidina al 0,05%. Si bien algunos recomiendan el uso del agua oxigenada en el lavado de la herida, el breve período de exposición al peróxido de hidrógeno al 3% hace que no sea efectivo contra microorganismos anaeróbicos y su actividad contra las bacterias aerobias también es insignificante (Pavletic, 2011; Tello, 2007). Su mayor ventaja radica en el efecto espumante que produce arrastre de cuerpos extraños (aporte de cátedra de equinos). Asimismo, como desventaja posee un efecto enlentecedor de la cicatrización, produciendo trombosis de la microvasculatura. Seguidamente, se debe desbridar la herida para remover tejido desvitalizado, contaminado o infectado y detritos o cuerpos extraños. Continuamos con sutura de la herida siempre que se espere que cicatrice por primera intención. En algunas ocasiones se recurrirá a permitir cierre primario demorado con la utilización de drenaje, si fuera necesario. En los casos que se presente contaminación o infección, restos de tejidos necróticos o desvitalizados se optará por permitir el cierre por segunda intención (Tello, 2007). También se pueden usar colgajos cutáneos o injertos libres, pero la cicatrización por segunda intención es prolongada. También se llevan a cabo técnicas reconstructivas cuando la cicatriz epitelizada es frágil y por lo tanto se intenta el cierre quirúrgico final. Posteriormente se procede a antibioticoterapia (Pavletic, 2011).

1.6 FACTORES QUE ALTERAN LA CICATRIZACIÓN

Las complicaciones más comunes en las heridas se deben a la edad, anemia y hemorragia, malnutrición, antiinflamatorios no esteroides (AINE),

⁹ Producto formado por una solución de povidona y yodo molecular, empleado frecuentemente como desinfectante y antiséptico, principalmente para tratar cortes menores en la piel.

corticosteroides, traumatismos, infecciones (Stashak, 1994a). Animales jóvenes tienen una mejor cicatrización comparada con adultos, además estos últimos son más susceptibles a infecciones que tienden a disminuir la formación de tejido de granulación. La hipoproteinemia altera la fibroplasia, neoangiogénesis, la remodelación y resistencia de la tensión. Deficiencias en zinc, cobre y otros minerales, así como deficiencias en vitaminas presenta una mala cicatrización (Stashak,1994b).

2 SANGRE

2.1 DEFINICIÓN

Según Voigt (2003), la sangre está formada por una parte acelular o plasma y otra parte celular formada por glóbulos rojos o eritrocitos, glóbulos blancos o leucocitos y trombocitos o plaquetas (fig. 3). Si se permite la coagulación de la sangre, ella utilizará numerosas proteínas del plasma para formar el coágulo y el fluido se llamará suero (Voigt, 2003).

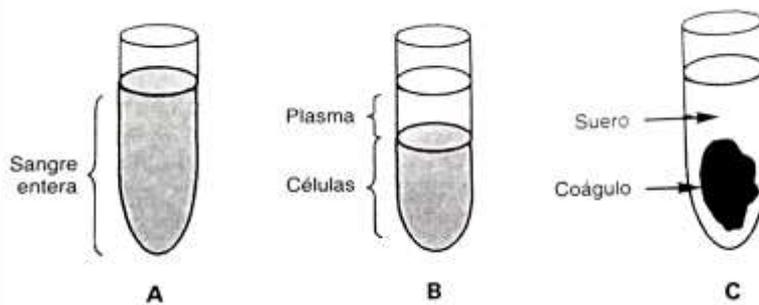


Figura 3: Diferencias físicas entre el plasma y el suero. (A) Mezcla de células y plasma en la sangre entera. (B) Al añadir anticoagulante, las células se separan del plasma. (C) Sin anticoagulante, las células y los factores de coagulación se separan del suero. Extraído de Voigt (2003).

Un animal tiene entre 5 a 11% de sangre del peso corporal (40-110ml/kg) lo que corresponde a un promedio del 8% del peso corporal como media para ilustrar el volumen de sangre (Voigt, 2003). Por lo tanto, de un animal sano se puede extraer, sin peligro, 0,5 mL sangre/kg de peso vivo, y en casos de ser necesario, pueden extraerse cantidades mayores, hasta 10mL por de peso corporal, como en animales donantes sanos mientras se les proporcione tiempo, nutrición, cuidados necesarios para restaurar su volumen sanguíneo (Voigt, 2003).

Según Meyer y col. (2007a), el plasma consiste en agua, proteínas plasmáticas, sales inorgánicas, lípidos, carbohidratos, hormonas y vitaminas. El plasma se

obtiene a partir de la centrifugación de la sangre con anticoagulante a diferencia del suero que se obtiene de la centrifugación de una muestra de sangre sin anticoagulante permitiendo que la misma coagule (Meyer y col., 2007b).

2.2 RECuento CELULAR AUTOMÁTICO

Los eritrocitos y PLT pueden diferenciarse por el tamaño en muchas especies mediante contadores automáticos, pero no en gatos, los cuales tienen PLT grandes y eritrocitos pequeños (Meyer y col., 2007).

2.3 RECuento CELULAR MANUAL

La estimación de PLT en frotis de sangre de caninos es aproximada debiéndose observar 8 a 29 PLT/campo de inmersión en aceite 100x y este tipo de recuento manual sirve para estimar como muy bajo, bajo, normal o elevado (Willard y Tvedten, 2004a). Según Willard y Tvedten (2004), también se debe recordar que las PLT tienden a aglomerarse lo que conlleva a un recuento con más errores. El hallazgo de PLT largas y tubulares son formas grandes que, muestran cómo son liberadas en forma activa a partir de megacariocitos, PLT con formas irregulares y seudópodos pueden indicar activación de las mismas, y PLT más grandes que lo normal pueden hallarse en animales con anemias regenerativas o leucocitosis en ausencia de trombocitopenia (Willard y Tvedten, 2004b).

2.4 NÚMERO DE PLAQUETAS

Se recomienda cuantificar el número de PLT mediante analizadores de hematología, y también estimar el número de las mismas mediante frotis. La evaluación del frotis permite identificar problemas de hemostasia primaria sin necesidad de hemograma y sirve también para comparar si los resultados dados por el hemograma son correctos (Meyer y col., 2007a). Según Meyer y col. (2007b) para estimar PLT en el frotis, con el objetivo de inmersión se cuenta el número de PLT medio por campo (el valor normal es de 10 a 15 PLT) y se multiplica por 15000. Sin embargo, Willard y col. (2007) mencionan que el número de PLT varía entre 300 a $800 \times 10^3/\mu\text{L}$. Por otro lado, según Scarborough (1932) el conteo normal de PLT en *Canis familiaris* oscila entre 188000 a 482000 PLT por mm^3 de sangre, y según Day y col. (2004), el conteo normal es 150 a $400 \times 10^9/\text{L}$. Pero en este trabajo, utilizaremos el rango de PLT que varía entre 100 y $500 \times 10^9/\text{L}$ adoptado por la cátedra de pequeños animales de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

2.5 ERRORES EN MEDICIONES SANGUÍNEAS

La precisión de recuentos de células de la sangre, en este caso particular las PLT, depende de la calidad de la muestra, del aparato de medición, de la

extracción y del almacenamiento de la muestra (Meyer y col., 2007a; aportes de laboratorio de análisis clínicos de Facultad de Veterinaria, UdelaR). La presencia de coágulos invalida la muestra, la agregación plaquetaria temprana, el uso de reactivos vencidos, la mala calibración del equipo, los errores por parte del operador y las patologías que cursen con trombocitopenia también invalidan o anulan la muestra (Meyer y col., 2007b). Según el mismo autor, la agregación plaquetaria se acentúa con el almacenamiento siendo recomendado el procesado de la muestra lo más rápido posible para, evidenciará menor formación de agregados plaquetarios y leucocitarios. El EDTA y otros coagulantes parecerían formar grupos de PLT (Willard y Tvedten, 2004a). El máximo tolerable es de 30 minutos a 6 horas para el análisis de la sangre extraída (Willard D y Tvedten, 2004b).

2.6 HEMOSTASIA

La hemostasia (fig. 4) incluye todos los mecanismos implicados en evitar la pérdida de sangre de los vasos. Hall (2016) menciona a la hemostasia como la prevención de la pérdida de sangre. Se subdivide en 3 tipos:

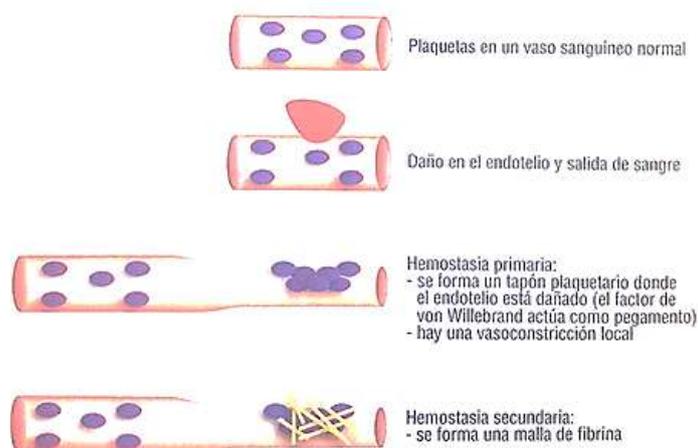


Figura 4: Hemostasia. Extraído de Day y col. (2004).

2.6.1 Hemostasia primaria (fig. 5): las PLT se hinchan y adoptan formas irregulares con pseudópodos que sobresalen su superficie (Hall, 2016). Entonces, se produce la activación y agregación de PLT y la unión de las PLT al endotelio vascular dañado o al tejido subendotelial mediante el factor de Willebrand (FvW) que actúa como pegamento entre PLT y el vaso. Otras proteínas adhesivas como el colágeno también participan. En segundos, se formará el tapón plaquetario inicial laxo y también se producirá una vasoconstricción local (Hall, 2016).

2.6.2 Hemostasia secundaria: También llamada coagulación. Se produce la formación de una malla o gel de fibrina que da lugar al coágulo firme. Se destaca la vía extrínseca e intrínseca que acaban en una vía común del paso de protrombina a trombina. Esta trombina conduce a la transformación del fibrinógeno soluble a fibrina insoluble.

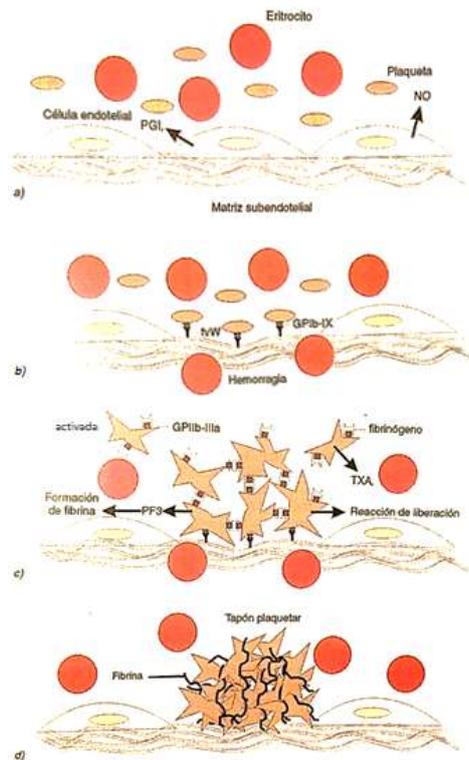


Figura 5: Ilustración de la hemostasia primaria. a) el endotelio intacto evita la adherencia de las PLT y libera inhibidores de la función plaquetas incluyendo prostaciclina (PGI₂) y óxido nítrico (NO). b) Cuando se rompe el endotelio, las PLT se adhieren por medio del factor de von Willerbrand (vW) al subendotelio expuesto. c) En corte superficial, las PLT se adhieren a través de receptores de integrina, a colágeno, laminina y fibronectina de la matriz subendotelial. La agregación plaquetaria se produce cuando el fibrinógeno se une a su receptor sobre a membrana de la PLT, por ello, el tapón plaquetario primario está formado de PLT unidas. Luego la fibrina solidifica el tapón plaquetario primario formando un trombo. Extraído de Day y col. (2004).

2.6.3 Fibrinólisis y contracoagulación: La fibrinólisis se produce una vez que el daño vascular ha sido reparado y consiste en la ruptura del coágulo de fibrina por parte de la plasmina para restablecer el flujo sanguíneo normal (Rebar y col., 2002a). La plasmina se forma a partir del plasminógeno que es una glicoproteína sintetizada por el hígado, presente en el plasma sanguíneo y la mayor parte del

fluido extracelular. En condiciones normales, no hay plasmina en circulación. (Rebar y col., 2002a).

La contracoagulación evita que se sigan formando coágulos una vez que el daño está reparado. En esta etapa actúa la antitrombina y su cofactor la heparina impidiendo la conversión de protrombina a trombina (Rebar y col., 2002b).

2.7 ANTICOAGULANTES

Los anticoagulantes como los agentes antiplaquetarios son medicamentos que impiden o reducen la coagulación de la sangre en el interior de las arterias, las venas o del corazón (aportes de cátedra de animales pequeños). Transcurridos de 2 a 5 minutos de la extracción de una muestra de sangre, ésta comenzará a condensarse o formar el coágulo. Para prevenir la formación del coágulo usamos anticoagulantes (ver cuadro 1). El EDTA ¹⁰ es el anticoagulante más usado (Voigt, 2003). Sin embargo, el citrato es el anticoagulante preferido para la toma de plasma para pruebas de función plaquetar (Meyer, 2007a). Las muestras se diluyen al 10% (Meyer, 2007b).

Casi todos los anticoagulantes se fijan al ión de calcio ¹¹ que es esencial para el proceso de coagulación sanguínea, siendo la trombina la única excepción (Voigt, 2003).

Cuadro 1: Anticoagulantes (extraído de Voigt, 2003).

PRODUCTO	MODO DE ACTUACIÓN	Cantidad requerida para 10ml de sangre	VENTAJAS	DESVENTAJAS
EDTA (sales de Na o K o ácido etilendiaminotetra-acético)	Forma sales insolubles de Ca	10-20mg (1ml al 1% de disolución o 2 gotas al 10% de disolución)	Buen poder de conservación; recomendado para pruebas rutinarias	Un exceso de más de 2mg/ml encoge las células. La sal de Na es menos soluble que la K
Heparina	Antitrombina y antitrombo-platina	1-2mg (0,2ml al 1% de disolución); puede humedecerse la jeringa y la aguja con una solución concentrada (10mg/ml)	Menores efectos sobre el tamaño y la hemólisis de eritrocitos; utilizados para analizar gases en sangre	Puede causar aglutinaciones de eritrocitos; inútil para frotis porque interfiere la tinción de los eritrocitos; caro; no prevendrá la coagulación por más de 8hrs

¹⁰ Ácido etilendiaminotetra-acético

¹¹ Ca²⁺

Citrato de sodio	Se combina al Ca para formar sales insolubles de citrato cálcico	10-20mg o para algunos estudios, una parte al 3,8% de disolución por 9 partes de agua	Puede usarse para transfusiones de sangre	Interfiere con muchas pruebas químicas; previene coagulación por pocas horas; encoge células
Oxalato potásico	Se une al Ca para formar oxalato cálcico insoluble	20mg o 2 gotas al 20% de disolución	Muy soluble	Causa un 6 a 8% de reducción de volumen celular; baja niveles de glucosa; altera electrolitos; tóxico
Oxalato sódico	Se une al Ca para formar oxalato cálcico insoluble	20mg	Usado para el tiempo de protrombina	Igual que oxalato potásico; encoge células
Oxalato amónico y potásico	Se une al Ca para formar oxalato cálcico insoluble	1ml o 20mg de polvo seco	Puede usar en la mayoría de pruebas hematológicas; produce menos distorsión que otros oxalatos	Anula la reducción celular que causa el potásico
Solución ACD (ácido cítrico-dextrosa)		Para transfusiones se usan 25ml de solución ACD en 100ml de sangre	Recomendado para transfusiones sanguíneas	

3 PLAQUETAS

3.1 GÉNESIS Y FUNCIONES

Las plaquetas (PLT) o trombocitos son fragmentos de células sanguíneas formadas en la médula ósea a partir de los megacariocitos donde se desarrollan a partir de células progenitoras mieloides pluripotenciales CD34+ residentes en el tejido hemopoyético y en el torrente sanguíneo (fig. 7) (Carmona y col., 2011). Presentan una variedad de tamaños y formas según la especie (Voigt, 2003).

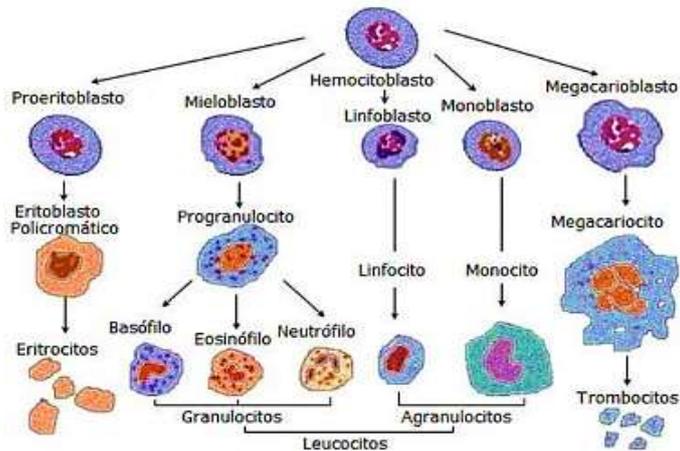


Figura 6: Origen de plaquetas. Extraído de <https://es.slideshare.net/victorcastillo271/las-plaquetas-origen-formación-y-función>

Desempeñan un papel primordial en la cicatrización de las heridas, ya que estos fragmentos citoplásmicos además de poseer propiedades hemostáticas (Hartwig e Italiano, 2003), también poseen propiedades proinflamatorias, reguladoras (Mannaioni y col., 1997) y acciones regenerativas (Man y col., 2000), las cuales están mediadas por la interacción con células (neutrófilos y células endoteliales) y por la liberación de FC, quimiocinas y otras moléculas (Anitua y col., 2004).

3.2 MEMBRANA DE LAS PLAQUETAS Y SUS RECEPTORES

La membrana de las PLT se compone de tres capas: glicocalix, fosfolipídica y submembranosa (Tablin, 2000a). El glicocalix es la capa exterior y más importante porque contiene receptores glicoproteicos implicados en la activación y adhesión de las PLT. Estas glicoproteínas constituyen los antígenos de membrana de las PLT, que se dividen en tres familias: integrinas, proteínas ricas en leucina y selectinas. La bicapa fosfolipídica asimétrica con propiedades anticoagulantes constituye la capa central (Tablin, 2000b). La capa submembranosa contiene los microtúbulos de actina y actúa como el esqueleto que da la forma discoidal a la PLT en reposo. Esta capa interviene activamente en los procesos de señalización plaquetaria (Spencer y Becker, 1997).

Las integrinas de la capa glicocalix producen agregación y adhesión plaquetaria (Pelagalli y col., 2003a). Están constituidas por dos subunidades, α (alfa) y β (beta), las cuales no están ligadas covalentemente. Las integrinas están conectadas de forma interna con el citoplasma de las PLT por una sola cola y, externamente con el medio por varias subunidades con dominios extracelulares. En la parte interior las integrinas están asociadas con las proteínas de

señalización (proteínas G, tirosina-quinazas) y fosfoinositoles (Pelagalli y col., 2003b).

La P-selectina es la principal molécula de adhesión de las PLT. Esta glicoproteína está presente en la superficie de los gránulos α que interactúan con fibrinógeno, factor von Willebrand (vWF), fibronectina y vitronectina (Mannaioni y col., 1997, Gentry, 2000; Pelagalli y col., 2003). La externalización de la integrina P-selectina está relacionada con la activación de las PLT (Segura y col., 2006).

3.3 CITOPLASMA Y GRÁNULOS DE LAS PLAQUETAS

La estructura de una PLT está formada por actina globular y filamentosa. La actina filamentosa actúa como soporte estructural para diferentes gránulos plaquetarios y mitocondrias (fig. 7). La respuesta plaquetaria se produce por una actividad contráctil mediada por la polimerización del complejo actina-miosina. Los microtúbulos citoplasmáticos mantienen la forma discoide de las PLT y dirigen los movimientos generados por actina-miosina (Hartwig e Italiano, 2003). Las PLT de los mamíferos contienen tres tipos de gránulos: lisosomales, densos y gránulos α (Mannaioni y col., 1997, Pelagalli y col., 2002).

Los gránulos lisosomales contienen hidrolasas ácidas, guanina, fosfolipasas y quinazas, que actúan como enzimas proteolíticas e hidrolíticas (Tablin, 2000). Los gránulos densos almacenan ATP¹², ADP¹³, calcio, fósforo y serotonina¹⁴. El ADP induce la migración plaquetaria y en combinación con la serotonina produce la contracción de las arterias lesionadas. El ATP antagoniza la acción del ADP (Pelagalli y col., 2002). Según Cho-Hee J y col. (2016), los gránulos α contienen varias moléculas (citocinas, quimiocinas, FC), algunas específicas para las PLT (por ejemplo, factores antiheparínicos como factor plaquetario 4 (PF-4) y β -tromboglobulina (β -TG)) y otras que no son específicas para ellas, tales como la albúmina, condroitín 4-sulfato, fibrinógeno, fibronectina, trombospondina, factor V, factor Va y factor von Willebrand (Mannaioni y col., 1997, Anitua y col., 2004). Estas proteínas o FC son importantes para todas las funciones plaquetarias, tales como la formación y crecimiento de trombos, modulación inflamatoria y la síntesis de matriz extracelular (ECM) durante la cicatrización de heridas (Gentry, 2000).

¹² Adenosina trifosfato

¹³ Adenosina difosfato

¹⁴ Monoamino neurotransmisor sintetizada en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central.

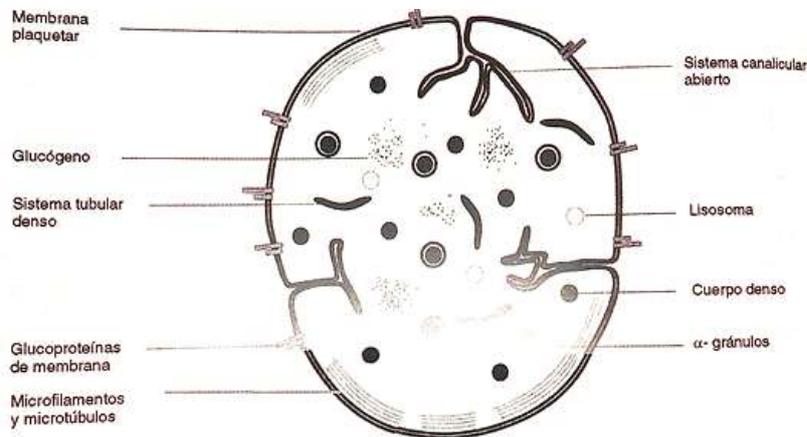


Figura 7: Ilustración de estructura de la plaqueta. Extraída de Day M y col. 2004.

3.4 RESPUESTA PLAQUETARIA

Cuando se produce lesión tisular, se dispara una fuerte interacción celular. Se producen respuestas plaquetarias independientes, tales como el cambio de forma, transformación interna, secreción de gránulos (Paes-Leme y col., 2006), formación del tapón hemostático primario y retracción del coágulo (Gentry, 2000; Tablin, 2000). Moléculas de la superficie plaquetaria, como las integrinas, regulan la capacidad de comunicación intercelular durante la formación del tapón hemostático, la respuesta inflamatoria y los procesos de reparación de tejidos (Mannaioni y col., 1997). La expresión cinética es diferente para cada tipo de gránulo plaquetario. Primero, los gránulos α liberan sus contenidos como consecuencia de estímulos de baja intensidad. Luego, los gránulos densos son activados y, finalmente, los gránulos lisosomales liberan sus productos proteolíticos (Gentry, 2000; Pelagalli y col., 2002). Esta cadena de eventos se conoce como *"reacción de liberación plaquetaria"* (Pelagalli y col., 2003).

Las PLT y sus proteínas secretadas, principalmente FC y quimiocinas, disparan el inicio del proceso inflamatorio y secuencialmente coordinan el incremento o la disminución del efecto de muchas células y moléculas implicadas en la cicatrización de las heridas (Carmona y col., 2009). Estos procesos aún no están totalmente elucidados.

Adhesión y cambio de forma son las primeras respuestas de PLT frente a estímulos fisiológicos como una lesión vascular que expone subendotelio que inducirá la adhesión de PLT. Además, cambian de forma hasta adoptar un aspecto característico que la diferencia de células en reposo (White, 1998). Las

PLT en reposo presentan contorno discoide con varios organelos en su interior siendo los más abundantes los gránulos de almacenamiento (alfa-gránulos, gránulos densos, lisosomas y microperoxisomas) (Larrimer NR y col., 1970).

4. MEDICINA REGENERATIVA

4.1 PLASMA RICO EN PLAQUETAS

El uso de PRP es una estrategia hoy en día que puede mejorar la aceleración de la cicatrización de las heridas (fig. 8) gracias a su concentración de PLT y por consiguiente a los FC que contienen, promoviendo así la regeneración tisular (Murga, 2003; Anitua y col., 2005; Kim y col., 2009; Vanat y col., 2012). Además, es una terapia simple, de bajo costo, mínimamente invasiva, no siendo perjudicial para el paciente (Filardo y col., 2011). Flores y col. (2011), mencionan que la regeneración de los tejidos duros y blandos tiene lugar mediante un complejo de eventos a nivel celular y molecular que son regulados por proteínas de señal en un proceso biológico en el cual las PLT juegan un papel decisivo. Varios estudios han demostrado que células madre adultas, osteoblastos, células endoteliales y epidermales expresan receptores de FC provenientes de PRP que también son fundamentales (Cho-Hee y col., 2016).

El PRP apunta como ventaja frente al gel o parche de fibrina (PF) por la presencia de un número mayor de FC y citoquinas que le dan un beneficio en la cicatrización (Vendramin y col., 2010) puesto que el PRP es una fracción del plasma que concentra un número de PLT mayor que los valores normales en sangre, pudiendo llegar a concentrar de 2 a 4 veces más que la concentración normal (Moreno y col., 2015; Cho-Hee y col., 2016). También Vanat y col. (2012), hacen mención que la concentración de PLT en el PRP para fines terapéuticos debe ser significativamente mayor que la concentración plasmática para proporcionar la liberación de FC en el lugar de la aplicación. Por consiguiente, el PRP es una rica fuente de FC que son importantes para la reparación y/o regeneración de los tejidos debido a la producción de colágeno, la mitosis, la diferenciación celular y la angiogénesis (Monteiro de Castro Neves, 2008; Flores y col., 2011; Vanat y col., 2012; Cho-Hee y col., 2016). Además, PRP tiene funciones como un factor quimiotáctico para células de músculo liso, fibroblastos, macrófagos, leucocitos y células progenitoras mesenquimales (Kim y col., 2009). El PRP también contiene una baja concentración de leucocitos que ayudan en el desbridamiento y presentan actividad antibacteriana en heridas crónicas (Crovetti y col., 2004; Kim y col., 2009).

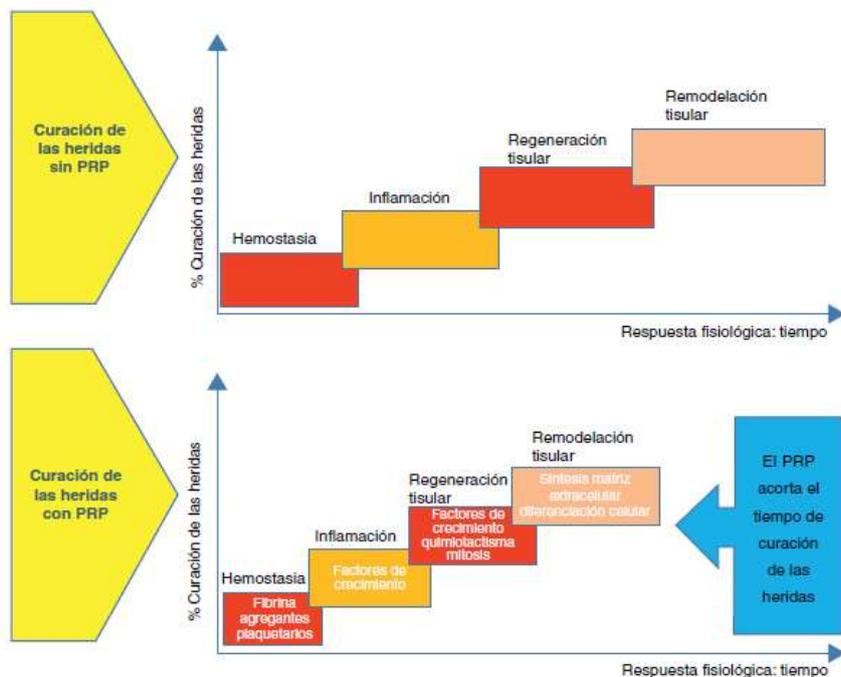


Figura 8: Diagrama esquemático del proceso de curación de las heridas en condiciones normales y de su aceleración cuando se aplica el preparado plasmático rico en PLT. Extraído de Rodríguez, J. (2012)

Marx, (2004) señaló que la clave del efecto regenerativo del PRP está asociada con el uso de “plaquetas vivas”. En ese sentido, las PLT deberían ser manipuladas con delicadeza durante la extracción venosa y subsecuentemente durante la preparación e inyección del PRP. La inyección de una dosis superior a lo normal de “plaquetas vivas” en tejidos lesionados podría dar lugar a una respuesta similar a la inducida por estos fragmentos citoplasmáticos cuando ocurre una lesión tisular. Marx, (2004) declaró que el número de PLT concentradas en un PRP debería ser mayor que un millón de fragmentos citoplasmáticos por μL . Anitua y col. (2004) han observado que concentraciones hasta de 300.000 PLT por μL pueden inducir un efecto terapéutico similar. Whitman y col. (1997) y Obarrio y col. (2000), consideran como valor ideal 500.000 a 1.000.000 de PLT por μL , y McLellan y Pelvin (2011) han demostrado que la solución de PRP al 10% tiene mayor efecto que una solución al 5%, y este efecto es aún mayor a una concentración al 100%. Y Schnabel y col. (2008) dicen que los distintos tejidos tienen requerimientos para la curación diferentes.

El PRP en estudio es de carácter autólogo por lo que impide la transmisión de enfermedades infecto-contagiosas y reacciones inmunológicas (Obarrio y col., 2000; Viegas y col., 2006; Vanat y col., 2012).

Los factores limitantes para el uso del procedimiento son debido a la presencia de trombocitopenia o inviabilidad o lisis celular por la cual los FC se liberan antes del tiempo (Marx, 2004; Barbosa y col., 2008; Dusse, 2008). Barbosa y col., (2006) destacan que la concentración de PLT en la sangre inicial del animal incide en la eficacia del PRP, de esa forma, la trombocitopenia es un factor limitante para la concentración adecuada de PLT.

Los protocolos y las técnicas usadas en la preparación y administración del PRP son muy variados (Landesberg e Glickman, 2000; Weibrich y col., 2004; Pagliosa e Alves, 2007). Marx y col. (1998) afirman que un protocolo de doble centrifugación es básico para que concentre PLT pues según ellos, el número de centrifugaciones, así como la fuerza de rotación influyen en una mayor concentración de PLT. Sin embargo, cada protocolo sigue un patrón de estudio (Wilson y col., 2006) y existen muchos protocolos de procesamiento de PRP (Casati y col., 2007; Jensen y col., 2004; Tae-Min You y col., 2007; Xie y col., 2013).

Su preparación es rápida pudiendo demorar en promedio entre 30 minutos (Vanat y col., 2012) a 45 minutos luego de sacar la sangre (Vendramin y col., 2006). El resultado es una concentración aumentada de PLT en un reducido volumen plasmático (fig. 9).

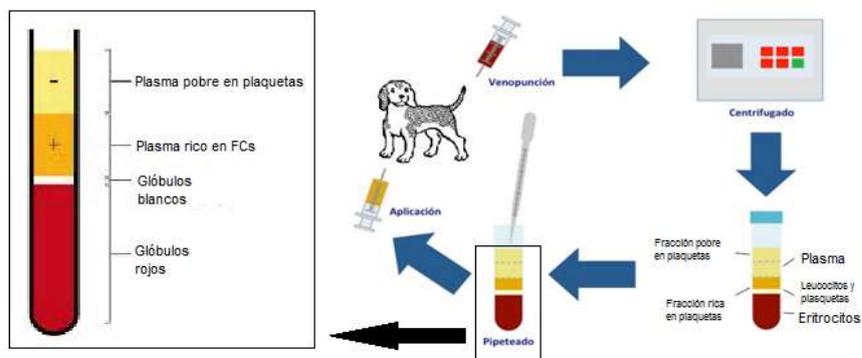


Figura 9: Preparación de Plasma, PRP, plasma pobre en plaquetas (PPP). Imagen propia del autor.

4.1.1 Uso de PRP en terapia regenerativa

El PRP se ha usado en biología, medicina humana y veterinaria, odontología, cirugía y ciencias afines (Paes-Leme y col., 2006; Bauer y col., 2009; Hermeto, 2010; Flores y col., 2011; Álvarez y col., 2012; Akita y col., 2013; Textor y col., 2013; Merlini y col., 2014; Mondino y col., 2016). En medicina de animales

menores, se reportaron buenos resultados en el tratamiento con PRP de heridas de piel en los perros (Kim y col., 2009; Lotfi y col., 2011; Alishahi y col., 2014). También en perros, el uso de PRP se ha reportado en osteogénesis, regeneración de ligamentos, reconstrucción de tendones (Cho- Hee y col., 2016), traumatismos (López y col., 2010) y afecciones locomotoras crónicas (Carmona y col., 2009).

4.2 FACTORES DE CRECIMIENTO

El efecto terapéutico del PRP está dado por la activación plaquetaria también llamada degranulación, principalmente de los gránulos α de las PLT con liberación de los FC y el clivaje del fibrinógeno para iniciar la formación de la matriz (Bosch y col., 2010; Wasterlain y col., 2012). La activación puede realizarse también de manera exógena mediante adición de trombina y/o cloruro de calcio (CaCl_2) (Man y col., 2000; Dusse y col., 2008). Según Reyes y col. (2002), se debe añadir 50 μL de CaCl_2 por cada ml de PRP o la combinación de ambos CaCl_2 y trombina (Textor y col., 2013; Mondino y col., 2016) y/o es posible activar el PRP mediante descongelado o la combinación de ellos (Johnson y col., 2011).

Los principales FC son el PDGF, $\text{TGF-}\beta_1$, factor de crecimiento fibroblástico básico FGF, factor de crecimiento semejante a insulina IGF, EGF, VEGF (Anitua y col., 2005; Weibrich y col., 2005; Beca y col., 2007) siendo los FC de mayor importancia en la regeneración y reparación del tejido, el PDGF, un potente agente quimiotáctico (Akita y col., 2013), el $\text{TGF-}\beta$ el cual estimula el depósito de matriz extracelular (Carter, 2003; Anitua y col., 2004; Beca y col., 2007) y el VEGF que modula la angiogénesis y favorece la proliferación del endotelio (Bennett y Schultz, 1993; Kliche y Wastenberg, 2001, Carter, 2003; DeRossi, 2009; Mondino y col., 2016). También el PRP contiene proteínas como fibrina, fibronectina y vitronectina, que actúan como moléculas de adhesión celular en los procesos de migración epitelial y formación del tejido conjuntivo (Oliva, 2008).

En el cuadro 2, se muestra un resumen que describe las principales características y la acción biológica de estas proteínas durante la cicatrización de heridas.

Cuadro 2. FC contenidos en los gránulos α de las PLT y sus funciones

FACTOR DE CRECIMIENTO	FUENTE	FUNCIÓN
FC transformante beta ($\text{TGF-}\beta$)	PLT, matriz ósea y cartilaginosa, linfocitos T helper activados, células natural killer, macrófagos, monocitos y neutrófilos	Estimula la proliferación de células mesenquimales indiferenciadas; regula la mitogénesis endotelial, fibroblástica y osteoblástica; regula la síntesis de colágeno y secreción

		de collagenasa; regula el efecto mitógeno de otros FC; estimula la quimiotaxis endotelial y la angiogénesis; inhibe la proliferación de los macrófagos y linfocitos ^{1,2,3}
FC fibroblástico básico (bFGF)	PLT, células mesenquimales, macrófagos, condrocitos, osteoblastos	Promueve el crecimiento y diferenciación de condrocitos y osteoblastos; favorece mitosis de células mesenquimales, condrocitos y osteoblastos ^{4,5}
FC derivado de PLT (PDGF)	PLT, osteoblastos, células endoteliales, macrófagos, monocitos y células musculares lisas	Favorece mitosis de células mesenquimales y osteoblastos; estimula la quimiotaxis y mitogénesis de fibroblastos, células de la glia y musculares lisas; regula la síntesis de collagenasa; estimula la quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos ^{1,6}
FC epidérmico (EGF)	PLT, macrófagos y monocitos	Estimula la quimiotaxis endotelial y angiogénesis; regula la secreción de collagenasa; estimula la mitogénesis epitelial y mesenquimal ^{7,8}
FC endotelial vascular (VEGF)	PLT y células endoteliales	Aumenta la angiogénesis y permeabilidad vascular; estimula la mitogénesis de células endoteliales ^{3,9,10}
FC de tejido conjuntivo (CTGF)	Endocitosis mediada por las PLT en la médula ósea	Promueve la angiogénesis; regeneración de cartílago, fibrosis y adhesión plaquetaria ^{11,12}
FC semejante a insulina (IGF-I)	PLT	Señaliza a las células mesenquimales y epiteliales a la migración, división y aumento de la síntesis de colágeno y matriz

FC: factor de crecimiento. 1. Pierce y col. (1991), 2. Bames y col. (1990), 3. Marsolais y Frenette (2005), 4. Roster y col. (1998), 5. Waing (1996), 6. Friesel y Maciag (1995), 7. Canalis y col. (1989), 8. Steenfos (1994), 9. Martin y col. (1992), 10. Rhee y col. (2004), 11. Hom y Maisel (1992), 12. Kubota y col. (2004), Schwartz-Arad y col. (2007). Fuente: Modificado a partir de Everts y col. (2006). Extraído de Maia y De Souza (2009c).

4.3 PARCHES DE FIBRINA

En los últimos años se ha desarrollado gran actividad científica enfocada en esta área de investigación (estudios básicos, preclínicos y clínicos) y rápidamente se ha ido acumulando evidencia que respalda el potencial terapéutico de la ingeniería de tejidos para la curación de heridas cutáneas (Huang y Burd, 2012).

Es una estrategia ampliamente utilizada que consiste en la aplicación de PF no sólo para reparación de heridas sino también como agente hemostático durante cirugías (Bishara y col., 1986; Spotnitz y col., 1997; Yücel y col., 2003; Murakami y col., 2009; Hermeto y col., 2012; Huand y Burd, 2012). Estos parches son productos no citotóxicos (Alves y col., 2014) que surgen de un procesamiento de plasma sanguíneo y su función es activar la última fase de la cascada de la coagulación, en la que la trombina activa la conversión del fibrinógeno en monómeros de fibrina y también activa al factor XIII para que, junto con el calcio, actúen en la polimerización de dichos monómeros, lo cual da resistencia al coágulo (Clark, 2003). La fibrina funciona como molécula puente para muchos tipos de interacciones célula-célula y provee una matriz provisional crítica en los sitios de injuria, inflamación o infección, permitiendo a las células proliferar, organizarse y llevar a cabo funciones especializadas. Se ha reportado que matrices de fibrinógeno y fibrina se unen a células endoteliales, células musculares lisas, queratinocitos, fibroblastos y leucocitos a través de receptores de integrina y de la superficie celular (Laurens y col., 2006). Se ha demostrado también, que la fibrina en sí misma tiene un efecto estimulante de la angiogénesis (Dvorak, 1987 y Liu, 1990). La matriz de fibrina parece ser un excelente sustrato para la invasión de células endoteliales y consecuente formación de nuevas estructuras tipo capilares (Van Hinsbergh y col., 2001) lo cual ayudaría a la reparación cutánea. Se ha visto también que la fibrina estimula a los fibroblastos a proliferar, expresar receptores de integrina apropiados y migrar a la herida (Becker y col., 2004).

La única desventaja mencionada del PF es debido a la dificultad de cubrir la herida en distintas posiciones del cuerpo, en las cuales no resulta fácil hacer un vendaje siendo limitada la duración del efecto de la terapia (Cho-Hee y col., 2016) como, por ejemplo, entrada de pecho, región de la babilla, entre otros.

Los PF han sido aprobados para hemostasis en Estados Unidos y la Unión Europea y son también utilizados para promover la curación de heridas (Burnouf y col., 2013). En la actualidad existen varios productos comerciales compuestos principalmente por fibrinógeno, trombina y CaCl_2 (Lynn, 2002; Wilson, 2008). También se han utilizado preparaciones de fibrinógeno a partir de la propia sangre del paciente, tales como las obtenidas por crioprecipitación o precipitación química, las cuales han demostrado una mayor utilidad en heridas (Clark, 2003). Estas preparaciones no contienen solamente fibrinógeno sino también otros componentes de la sangre necesarios para la formación del coágulo. Para conseguir el efecto deseado, el plasma debe gelificarse y activarse. La activación involucra 2 procesos clave: la degranulación de las PLT para liberar los gránulos α y el clivaje del fibrinógeno para iniciar la formación de la matriz (Wasterlain y col., 2013).

4.3.1 USO DE PF EN TERAPIA REGENERATIVA

Los PF han sido probados en diferentes modelos de animales donde algunos estudios fueron realizados con crioprecipitados u otras preparaciones crudas de fibrinógeno de los animales bajo estudio o de plasma humano, mientras que otros estudios fueron realizados con preparaciones comerciales de PF de pureza variable (Clark, 2001a). A pesar de estas diferencias en los diseños experimentales, la mayor parte de las veces, los resultados parecen depender del tipo de procedimiento y del órgano estudiado en el modelo animal como, por ejemplo, los PF parecen ser perjudiciales para la reparación interósea, osteocondral y reparación de ligamentos, sin embargo, se ha reportado como beneficioso en la reparación de meniscos, córnea, esclerótica y tejido periodontal (Clark, 2001b). Clark (2003) afirma que existen discrepancias acerca del efecto benéfico del uso de PF en reparación de heridas y sostiene que los resultados obtenidos en pacientes dependen de la fuente de fibrinógeno. Por ejemplo, fuentes comerciales de PF no redujeron el drenaje ni previnieron la formación de seroma luego de una mastectomía radical y/o resección de linfonodos axilares (Vaxman y col., 1995; Gilly y col., 1998) mientras que crioprecipitados autólogos de fibrinógeno sí lo hicieron (Moore y col., 1997) lo que sugiere que algún componente se pierde en las preparaciones comerciales de los PF mientras que el mismo es preservado en los crioprecipitados. La fibronectina, por ejemplo, es una glicoproteína con la habilidad de unir células a la matriz extracelular y podría ser uno de los factores que se pierden. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que, aunque los PF se nombran como una entidad única, realmente representan una mezcla de fibrinógeno y otros materiales (Clark, 2003).

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la eficacia del uso de tratamientos utilizando PRP y PF en la reparación de heridas cutáneas en casos clínicos caninos.

Objetivos específicos

1. Recopilación de fichas clínicas de heridas cutáneas en caninos ingresados en los últimos 3 años al Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, UdelaR.
2. Puesta a punto de la obtención de PRP y PF.
3. Evaluar el efecto combinado de aplicación de inyecciones perilesionales de PRP y la aplicación de PF autólogos sobre heridas cutáneas.
4. Comparar el tiempo en la demora de la cicatrización con ambos tratamientos.

HIPÓTESIS

La aplicación de PRP y PF acelerará la cicatrización de heridas en caninos debido al gran aporte de FC y estimulantes de la epitelización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recopilación de datos

Se hizo un relevamiento de casos clínicos sobre las heridas en pacientes que frecuentaron el Hospital de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, en los últimos 3 años. También se investigaron pacientes con estas lesiones de piel en clínicas veterinarias de Montevideo y Rivera.

Animales

Para el estudio en cuestión, se usaron 8 caninos (*Canis familiaris*) adultos, mayor a un año y sin distinción de sexo, los cuales estaban clínicamente sanos con un peso igual o superior a 5 kg de peso vivo. Los animales presentaron tipos de lesiones semejantes en cuanto a su demora en la reparación. Se dividieron en grupos, grupo control integrado de 3 casos que fueron tratados con tratamiento tradicional y otro grupo prueba con 6 casos tratados con medicina regenerativa. Tuvieron acceso libre al alimento y agua, y se alojaron en sus propias casas. El protocolo experimental fue autorizado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, número de referencia 378, UdelaR.

Recolección de muestras

Para la extracción de sangre, se realizó la tricotomía de la zona ventro-lateral del cuello y se embrocó con yodopovidona y alcohol 96%. Por medio de venopunción, se extrajo un máximo de 5 mL/Kg de peso vivo (P/V) de sangre periférica autóloga de la vena yugular de los ejemplares con jeringa de 20 mL y mariposa calibre 21G cargada con anticoagulante citrato de sodio al 3,8% P/V. Previo a la preparación de PRP y PPP, se realizó hemograma de cada muestra de sangre entera de cada paciente para obtener conteo de PLT normal en sangre.

Obtención de plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas

Se obtuvo el PRP y plasma pobre en PLT (PPP) de la sangre periférica autóloga adaptado de lo descrito por Tae-Min You y col. (2007). Se centrifugó la sangre a 2400 rpm por 10 minutos a 4 - 8 °C para separar plasma de la sangre entera. A la fracción obtenida de plasma se centrifugó nuevamente a 3600 rpm por 15 minutos, para separar PRP del PPP. Se extrajo una submuestra de PRP y PPP

y se realizó el recuento plaquetario y control microbiológico a ambas. El resto de las muestras se conservó en freezer a -20 °C hasta su uso en el caso clínico.

Tratamiento tradicional para grupo control

Se rasuró ampliamente la zona de la herida desde los bordes para obtener una zona limpia, sin pelos. Luego se hizo un primer lavado de la herida con solución fisiológica seguido por solución yodada 0,1 a 0,2% o diacetato de clorhexidina al 0,05%. Se desbridaron bordes con tejido necrótico y posterior sutura de la misma siempre que se espere que cicatrice por primera intención. En algunas ocasiones se recurrió a permitir cierre primario demorado con la utilización de drenaje, si fuera necesario. En los casos que se presente contaminación o infección, restos de tejidos necróticos o desvitalizados se optará por permitir el cierre por segunda intención. Finalmente se procede a antibioticoterapia basada en la administración oral de comprimidos de enrofloxacin a razón de 10 mg /Kg p/v por día durante 5 a 10 días.

Tratamiento con PRP y PF para grupo medicina regenerativa

Se procedió a descongelar el PRP y se lo activó con CaCl_2 al 10% P/V, por cada mL de PRP se agregó 50 μL de CaCl_2 al 10%. Se inyectó en 8 puntos de los bordes de la herida -inyecciones perilesionales- semanalmente durante 4 semanas. El PPP también se descongeló y se activó; por cada mL de PPP se agregó 50 μL de CaCl_2 al 10% dispensándolo sobre una gasa estéril de forma cuadrangular con una superficie suficiente para cubrir la herida, convirtiéndola en parche de fibrina (PF) (protocolo adaptado de Mondino y col., 2016). Posteriormente, se realizó un vendaje compresivo con algodón laminado y venda elástica o venda elástica autoadherente (según disponibilidad). Los vendajes se retiraron a las 24 hrs de colocados. A este último también se realizó 1 aplicación por semana durante 4 semanas.

Análisis morfométrico macroscópico

Semanalmente fueron evaluadas las heridas mediante fotografía junto a una regla para poder cuantificar el área de las mismas utilizando el software ImageJ (Kim y col., 2012). Se calculó el área de contracción de la herida (C o C_{dx}) restando al área inicial (A_i - determinada la semana 0 menos el área de lesión obtenida de las mediciones subsiguientes (A_{dx} - semana 1, 2 y 3). De forma que $C_{dx} = A_i - A_{dx}$. Con estos resultados se obtuvo la tasa de contracción de la herida siendo $TC = C_{dx}/A_i$.

Evolución del tratamiento

Se evaluaron signos de inflamación y la tasa de contracción de las heridas. Para la medición de la reducción del tamaño se usó el programa ImageJ que adaptó las fotografías en una misma escala para poder estimar subjetivamente el perímetro, el área y la tasa de contracción de cada herida en particular.

Análisis microbiológico

Las submuestras de PRP y PPP extraídas, se cultivaron en dos tipos de medios destinado PCA¹⁵ y agar sangre para el aislamiento y detección de microorganismos contaminantes. El agar sangre permite aislar y cultivar microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes mientras que el PCA sólo permite el crecimiento de bacterias aeróbicas.

RESULTADOS

1. Relevamiento sobre casos clínicos de heridas en la especie canina en Facultad de Veterinaria (UdelaR) y veterinarias de Rivera.

El relevamiento de los casos clínicos de heridas cutáneas en pacientes caninos que frecuentaron el Hospital de la Facultad de Veterinaria (UdelaR) en los últimos 3 años y clínicas veterinarias privadas en Rivera (ver anexo 1 y 2) apuntaron que son casos atípicos debido a que no todos los propietarios recurren a las clínicas veterinarias solo para el tratamiento de una herida que la consideran clínicamente sana, a no ser que la vean con infección (presencia de pus) o noten la demora excesiva en la curación. Las causas más frecuentes de lesiones son: politraumatizados y mordeduras (fig. 11). Se pudo constatar también que, en la mayoría de los casos se hace un lavado con solución fisiológica o povidona yodada previo al tratamiento con antibióticos (fig. 11). Todos los profesionales veterinarios usaron antibioticoterapia.

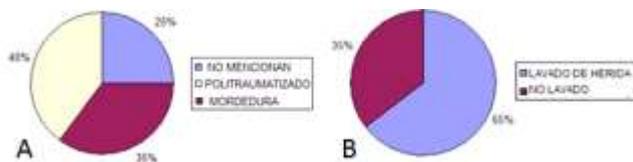


Figura 10: Resultados del relevamiento de casos clínicos. A) Causas más frecuentes de herida, B) limpieza de herida.

¹⁵ Plate Count Agar (PCA)

Casos clínicos

Se analizó el proceso de cicatrización de heridas en un total de 8 pacientes caninos de distintas razas, adultos, mayor a un año y sin distinción de sexo, los cuales estaban clínicamente sanos con un peso igual o superior a 5 kg de peso vivo que llegaron a la clínica del Hospital de Facultad (UdelaR) y clínicas veterinarias de Rivera. Fueron distribuidos en grupo control (tratamiento tradicional) y grupo medicina regenerativa (tabla 1).

Tabla 1: Distribución de las muestras por edad y peso tomadas en cuenta en el estudio.

CASO	RAZA	EDAD	PESO
1	Cruza	4 años	25 kg
2	Cruza	5 años	5 kg
3	Ovejero Alemán	3 años	18 kg
4	Cruza	7 años	30 kg
5	Cruza	1 año	12 kg
6	Cruza	7 años	20 kg
7	Cruza	4 años	25 kg
8	Cruza	4 años	10 kg

Los casos clínicos estudiados presentaron heridas semejantes en cuanto a la demora en el tiempo de cicatrización. En todos los casos, las heridas involucraban planos profundos de músculos y piel. Además, eran heridas desgarrantes, contaminadas y profundas.

2.1 Grupo medicina regenerativa

2.1.1 Caso 1: SOL

Canino hembra, cruza de 4 años aproximadamente. Sol es perra que fue encontrada el día 2 de setiembre de 2016. Presentaba una herida contaminada, profunda con bordes irregulares y dentados de alrededor de 12,5 cm de diámetro en la zona lateral del miembro posterior izquierdo (fig. 19). Se comenzó a tratar con terapia de medicina regenerativa en base a PRP y PF el jueves 22 de setiembre del mismo año, correspondiente a la semana 1 (ver cuadro 3). Luego se realizaron 3 aplicaciones más correspondientes a las semanas 2, 3 y 4 (fig.11). El paciente fue únicamente tratado con medicina regenerativa, no se le administró ningún tipo de fármaco como antibióticos, antiinflamatorios u otros.

Cuadro 3: Cuadro de datos: cantidad de sangre extraída, obtención de PRP y PPP, y recuento de PLT en PRP y PPP del caso 1.

SEMANA	SANGRE	PLASMA	PRP	PPP	PLT EN PRP	PLT EN PPP
1	20 mL	14 mL	2,5 mL	11,5 mL		
2	20 mL	13 mL	2 mL	11 mL		
3	20 mL	13 mL	3 mL	10 mL	27x10 ⁹ /L	25x10 ⁹ /L
4	20 mL	13 mL	3 mL	10 mL		

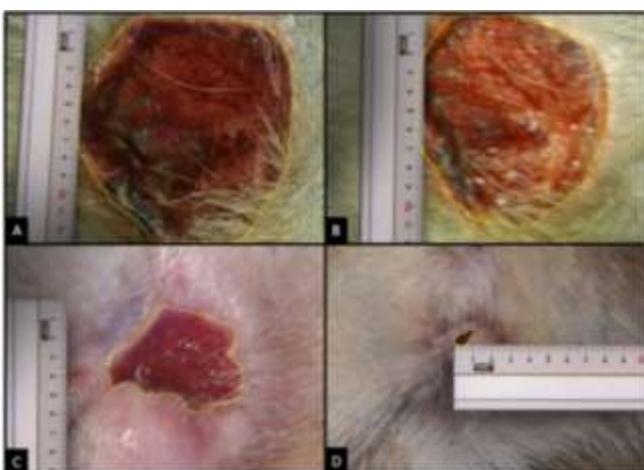


Figura 11: Reducción de la herida. A) Semana 1: Herida de 12,5 cm al inicio del tratamiento. B) Semana 2: Reducción de 2,5 cm. C) Semana 3: Reducción de 3,5 cm. D) Reducción de 5 cm y resolución de la misma.

2.1.2 Caso 2: NEGRITA

Canino hembra, raza caniche de 5 años aproximadamente. Negrita es una perra cuyo propietario la llevó a Facultad de Veterinaria (UdelaR), para rehabilitación. Ingresó en mayo del 2016 por problemas de parálisis de miembros posteriores. Además, presentaba una herida contaminada con bordes irregulares y con un diámetro aproximado de 6 cm entre la cola y el ano (fig. 19) debido a la posición diaria adoptada por la parálisis. Se comenzó a tratar con terapia de medicina regenerativa en base a PRP y PF el jueves 8 de setiembre del mismo año por primera vez, correspondiente a la semana 1 (ver cuadro 4). Luego se realizaron 2 aplicaciones más correspondientes a las semanas 2 y 3 (fig. 12). El animal fue únicamente tratado con medicina regenerativa, no se le administró ningún tipo de fármaco como antibióticos, antiinflamatorios u otro.

Cuadro 4: Cuadro de datos: cantidad de sangre extraída, obtención de PRP y PPP, y recuento de PLT en PRP y PPP del caso 2

SEMANA	SANGRE	PLASMA	PRP	PPP	PLT EN PRP	PLT EN PPP
1	10 mL	5 mL	1,5 mL	3,5 mL		
2	10 mL	6 mL	1,5 MI	4,5 mL		
3	10 mL	5 mL	1,5 MI	3,5 mL		
4					39x10 ⁹ /L	17x10 ⁹ /L



Figura 12: Reducción de la herida. A) Primera aplicación de terapia regenerativa. B) Semana 1: Herida de 4,5 cm al inicio del tratamiento. C) Semana 2: Reducción de 2 cm. D) Semana 3: Reducción total de la herida.

2.1.3 Caso 3: PATITA

Canino macho, cruzado de 3 años aproximadamente. Patita, apodado así por los rescatistas, es un perro callejero de la ciudad de Rivera. Ingresó a una veterinaria particular por fractura de metatarso derecho. Además, presentaba una herida contaminada con bordes regulares y con dimensiones de 17 cm de largo por 5 cm de ancho, en el mismo lugar que la fractura (fig. 19). En este caso, se tuvo en cuenta solo la medida del largo. Se comenzó a tratar con terapia de medicina regenerativa en base a PRP y PF el jueves 8 de diciembre de 2016 correspondiente a la semana 1 (ver cuadro 5). Luego se realizaron 3 aplicaciones más, correspondientes a las semanas 2, 3 y 4 (fig. 13). El animal fue únicamente tratado con medicina regenerativa, no se le administró ningún tipo de fármaco como antibióticos, antiinflamatorios u otro.

Cuadro 5: Cuadro de datos: cantidad de sangre extraída, obtención de PRP y PPP, y recuento de PLT en PRP y PPP del caso 3

SEMANA	SANGRE	PLASMA	PRP	PPP	PLT EN PRP	PLT EN PPP
	20 mL	14 mL	3 mL	12 mL		
2	20 mL	12 mL	2,5 mL	9,5 mL		
3	20 mL	13 mL	3 mL	10 mL		
4	20 mL	13 mL	3 mL	10 mL	163x10 ⁹ /L	34x10 ⁹ /L

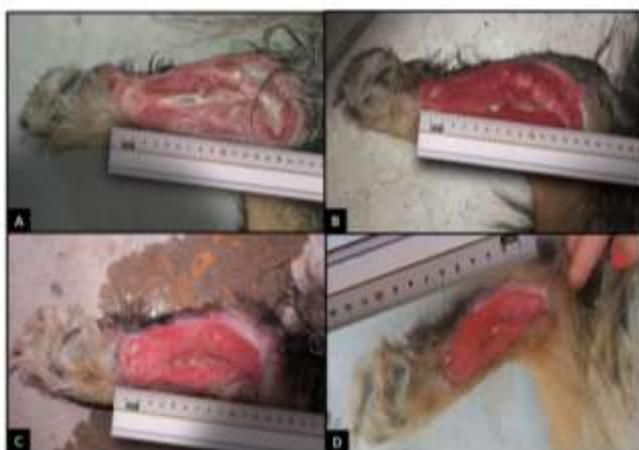


Figura 13: Reducción de la herida. A) Semana 1: Herida de 17,5 cm al inicio del tratamiento. B) Semana 2: Reducción de 2,5 cm de largo. C) Semana 3: Reducción de 3 cm de largo. D) Reducción de 4 cm de largo.

2.1.4 Caso 4: LUNA

Canino hembra, raza ovejero alemán de 7 años aproximadamente. Luna es una perra cuyo propietario la llevo a rehabilitación en Facultad de Veterinaria (UdelaR), el día 8 de diciembre de 2016. Presentaba herida profunda, bordes regulares, contaminada, alrededor de 15 cm de diámetro en la región del glúteo del miembro posterior izquierdo (fig. 19). Se comenzó a tratar con terapia de medicina regenerativa en base a PRP y PF el jueves 15 de diciembre del mismo año por primera vez, correspondiente a la semana 1 (ver cuadro 6). Luego se realizaron 3 aplicaciones más correspondientes a semana 2, 3 y 4 (fig. 14). El animal fue únicamente tratado con medicina regenerativa, no se le administró ningún tipo de fármaco como antibióticos, antiinflamatorios u otro.

Cuadro 6: Cuadro de datos: cantidad de sangre extraída, obtención de PRP y PPP, y recuento de PLT en PRP y PPP del caso 4

SEMANA	SANGRE	PLASMA	PRP	PPP	PLT EN PRP	PLT EN PPP
1	20 mL	14 mL	2,5 mL	11,5 mL		
2	20 mL	12 mL	2,5 mL	9,5 mL		
3	20 mL	13 mL	3 mL	10 mL		
4	20 mL	13 mL	3 mL	10 mL	593x10 ⁹ /L	11x10 ⁹ /L

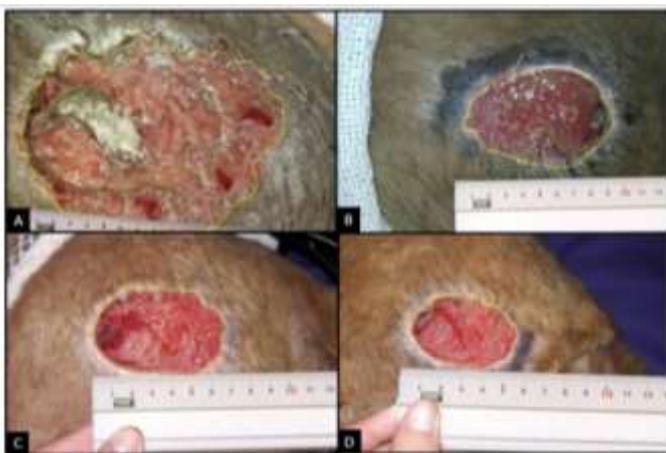


Figura 14: Reducción de la herida. A) Semana 1: Herida de 13 cm de diámetro al inicio del tratamiento. B) Semana 2: Reducción de 3 cm de diámetro. C) Semana 3: Reducción de 3,5 cm de diámetro. D) Reducción de 1 cm de diámetro.

2.1.5 Caso 5: RON

Canino macho, cruce de 1 año aproximadamente. Ron ingresó el día 13 de febrero de 2017, a una veterinaria en la ciudad de Rivera porque presentaba como complicación de un traumatismo, una miasis ¹⁶ en distal de miembro posterior derecho, el cual tuvo que ser amputado (fig. 19). Se produjo dehiscencia de los puntos de la sutura de piel por lo que quedó expuesto el músculo y parte del hueso. Se comenzó a tratar con terapia de medicina regenerativa en base a PRP y PF el viernes 17 de febrero del mismo año por primera vez, correspondiente a la semana 1 (ver cuadro 7). Luego se realizaron 3 aplicaciones más, correspondientes a las semanas 2, 3 y 4 (fig. 15). El animal fue únicamente tratado con medicina regenerativa, no se le administró ningún tipo de fármaco como antibióticos, antiinflamatorios u otro.

¹⁶ Enfermedad parasitaria ocasionada por larvas de mosca *Dermatobia hominis* que afecta los tejidos y órganos.

Cuadro 7: Cuadro de datos: cantidad de sangre extraída, obtención de PRP y PPP, y recuento de PLT en PRP y PPP del caso 5.

SEMANA	SANGRE	PLASMA	PRP	PPP	PLT EN PRP	PLT EN PPP
1	20 mL	13 mL	3 mL	10 mL		
2	20 mL	12 mL	2,5 mL	9,5 mL		
3	20 mL	10 mL	2,5 mL	7,5 mL		
4	20 mL	10 mL	2,5 mL	7,5 mL	115x10 ⁹ /L	25x10 ⁹ /L



Figura 15: Reducción de la herida. A) Semana 1: Herida de 10 cm de diámetro al inicio del tratamiento. B) Semana 2: Reducción de 3 cm de diámetro. C) Semana 3: Reducción de 2,5 cm de diámetro. D) Reducción de 1 cm de diámetro.

2.1.6 Caso 6: ANGEL

Canino macho, cruce de 9 años aproximadamente. Ángel ingresó el día 22 de febrero de 2017, a una veterinaria en la ciudad de Rivera por una miasis (complicación de un traumatismo) en región lateral derecha de la cara (fig. 19). Se procedió a retirar larvas y limpiar la herida. Posteriormente, se comenzó a tratar con terapia de medicina regenerativa en base a PRP y PF el viernes 24 de febrero del mismo año por primera vez, correspondiente a la semana 1 (ver cuadro 8). Luego se realizaron 2 aplicaciones más, correspondientes a las semanas 2 y 3 (fig. 16). El animal fue únicamente tratado con medicina regenerativa, no se le administró ningún tipo de fármaco como antibióticos, antiinflamatorios u otro.

Cuadro 8: Cuadro de datos de cantidad de sangre extraída, obtención de PRP y PPP, y recuento de PLT en PRP y PPP del caso 6.

SEMANA	SANGRE	PLASMA	PRP	PPP	PLT EN PRP	PLT EN PPP
1	20 mL	14 mL	3 mL	10 mL		
2	20 mL	13 mL	2 mL	11 mL		
3	20 mL	14 mL	3 mL	11 mL		
4					187x10 ⁹ /L	14x10 ⁹ /L

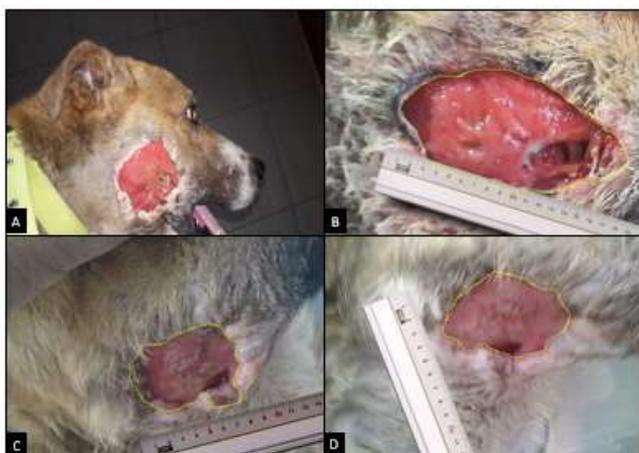


Figura 16: Reducción de la herida. A) Herida al inicio del tratamiento. B) Semana 1: Herida de 15 cm de largo. C) Semana 2: Reducción de 6 cm de diámetro. D) Reducción de 2,5 cm de diámetro.

GRUPO CONTROL CON TRATAMIENTO TRADICIONAL

2.1. 7 Caso 7: Amarelinho

Canino macho, cruce de 4 años aproximadamente. Amarelinho ingresó el día 7 de abril de 2017, en una veterinaria en la ciudad de Rivera con una herida en región proximal de húmero en miembro anterior derecho (fig. 19). Se procedió a limpiar la herida y se dejó sin vendar. Posteriormente, se comenzó con tratamiento en base a enrofloxacina 20 mg/kg vía oral durante 7 días a partir del día de ingreso (semana 1). Las siguientes 3 semanas, solamente se limpiaba la herida día por medio. Se registraron fotografías semanales de la herida para calcular su evolución en el tiempo (demora de la cicatrización) (fig. 17). El animal únicamente fue tratado con ese fármaco, no se le aplicó PRP ni PF.

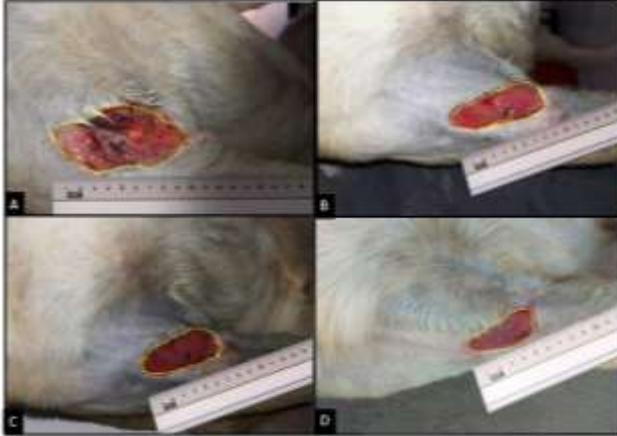


Figura 17: Reducción de la herida del caso 7. A) Semana 1: Herida al inicio de 10 cm de largo, B) Semana 2: Reducción de 0,5 cm. C) Semana 3: Reducción de 1 cm de largo. D) Reducción de 2 cm de largo.

2.1.8 **Caso 8:** Peludinho

Canino macho, cruza de 4 años aproximadamente. Peludinho ingresó el día 23 de mayo de 2017, en una veterinaria en la ciudad de Rivera con una herida en el pabellón auricular izquierdo (fig. 19). Se procedió a limpiar la herida y se dejó sin vendar. Posteriormente, se comenzó con tratamiento en base a enrofloxacina 20 mg/kg vía oral durante 7 días a partir del día de ingreso (semana 1). Las siguientes 3 semanas, solamente se limpiaba la herida día por medio. Se registraron fotografías semanales de la herida para evaluar su evolución en el tiempo (fig. 18). El animal únicamente fue tratado con ese fármaco, no se le aplicó PRP ni PF.

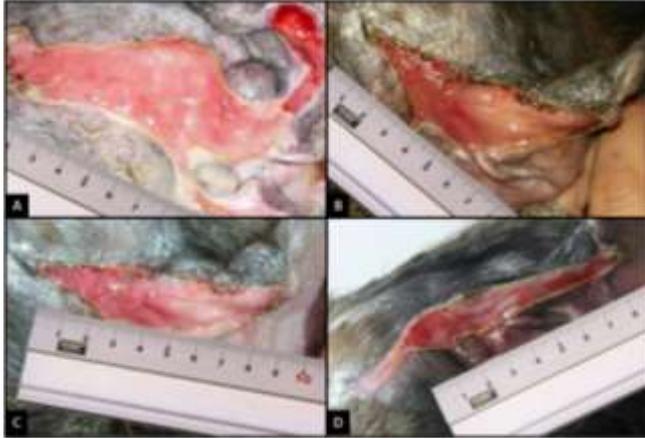


Figura 18: Reducción de la herida del caso 8. A) Semana 1: Herida al inicio de 10,5 cm de largo, B) Semana 2: Reducción de 0,5 cm. C) Semana 3: Reducción de 1 cm de largo. D) Reducción de 1 cm de largo.

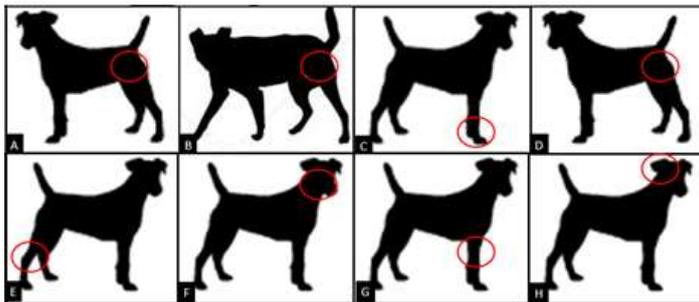


Figura 19: Ubicación anatómica de la lesión en cada caso clínico. A) Caso clínico 1. B) Caso clínico 2. C) Caso clínico 3. D) Caso clínico 4. E) Caso clínico 5. F) Caso clínico 6. G) Caso clínico 7. H) Caso clínico 8.

2. Cálculo del área y perímetro de los casos clínicos basado en el uso del programa ImageJ.

Semanalmente fueron evaluadas las heridas mediante fotografías junto a una regla milimetrada para poder cuantificar el área de las mismas utilizando el software ImageJ¹⁷. Se calculó el área y el perímetro de las heridas al inicio de cada caso (ver cuadro 9). Seguidamente, se calculó la contracción de la herida (C_{dx}) restando al área inicial (A_i), determinada el día de la llegada del paciente a la clínica y el área de lesión obtenida de las mediciones subsiguientes (A_{dx}). De

¹⁷ Image Processing and Analysis in Java (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

forma que $C_{dx}=A_i-A_{dx}$ (ver cuadro 10, extraído de tesis de Mondino y Campbell, 2015). Con estos resultados se obtuvo la tasa de contracción (TC) de la herida siendo $TC=(C_{dx}/A_i) \times 100$ (ver cuadro 10) la cual indica cuánto se redujo la misma. Se realizó un gráfico para visualizar la evolución de la contracción de la herida durante las semanas (fig. 20).

Cuadro 9: Medidas del área y perímetro de las heridas en todos los casos

Animal	Área (cm ²)	Perímetro (cm)
Sol	133	42
	109	38
	29	23
	1	5
Negrita	90	41
	12	14
	2	7
	S/D	S/D
Patita	95	46
	55	37
	37	27
	32	27
Luna	127	45
	50	22
	24	20
	19	16
Ron	82	38
	51	27
	39	23
	32	22
Ángel	119	43
	45	27
	38	27
	S/D	S/D
Amarelinho	29	21
	12	16
	10	14
	7	12
Peludinho	85	55
	49	38
	26	29
	15	22

*S/D: Sin datos

Cuadro 10: Tasa de contracción

Animal	A _i	A _{dx}	C _{dx} =A _i -A _{dx} .	TC%= (C/A _i)x100
Sol	133			

		109	24	18,05
		29	104	78,20
		1	132	99,25
Negrita	90			
		12	78	86,67
		2	88	97,78
		S/D	90	100,00
Patita	95			
		55	40	42,11
		37	58	61,05
		32	63	66,32
Luna	127			
		50	77	60,63
		24	103	81,10
		19	108	85,04
Ron	82			
		51	31	37,80
		39	43	52,44
		32	50	60,98
Ángel	119			
		45	74	62,18
		38	81	68,07
		S/D	S/D	S/D
Amarelinho	29			
		19	10	34,48
		16	13	44,83
		12	17	58,62
Peludinho	31			
		24	7	22,58

19	12	50,00
15	16	66,67

*S/D: Sin datos

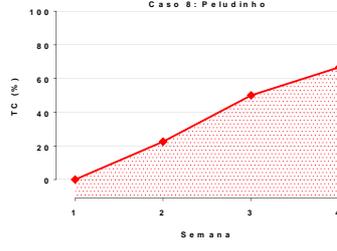
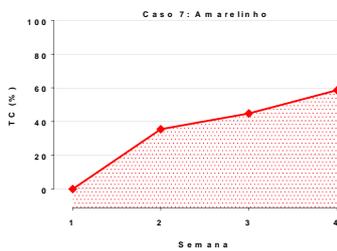
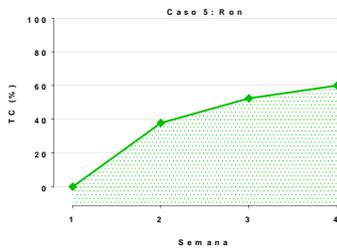
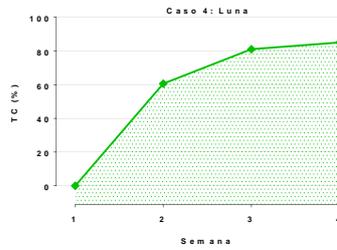
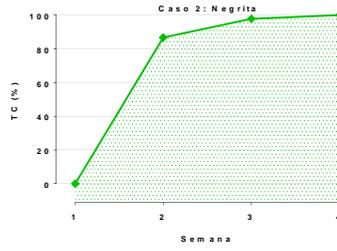
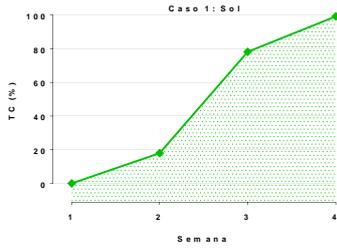


Figura 20: Área de la herida (cm) y tasa de contracción (TC %) de los casos clínicos.

3. Evolución clínica de los pacientes

La evolución clínica de los pacientes y la eficacia del uso de PRP y PF en la reparación de las heridas cutáneas fue satisfactoria habiendo mejoría en la cicatrización de las mismas. Los animales que fueron tratados con medicina regenerativa en base de PRP y PF mostraron exitosamente aceleración en la cicatrización de la herida con una tasa de reducción destacada macroscópicamente entre la semana 1 y 2 (fig. 20). Esto significó que, durante el pasaje de la semana 1 a la 2 los pacientes tuvieron la mayor diferencia en la evolución de la reparación de las heridas comparado, por ejemplo, entre la tercera y cuarta semana que se observó un cambio más constante. Por otro lado, se pudo observar que, los pacientes del grupo control (tratamiento tradicional - caso 7 y 8) también tuvieron un progreso positivo en la regeneración de las mismas, sin embargo, este progreso fue más parejo y sostenido en el tiempo no observándose cambios relevantes como en el grupo anterior. Posterior a las 4 semanas de iniciada la terapia, los animales mostraron cierre parcial o total de la lesión.

Pudo observarse que en el grupo medicina regenerativa, la cicatrización tuvo un mejor aspecto clínico y estético (o sea, el tejido de epitelización resultó macroscópicamente más limpio, aunque no se comprobó por histología). Esta ventaja del grupo medicina regenerativa se puede atribuir a las propiedades del PRP, que concentra un número de PLT mayor que los valores normales en sangre y éstas son significantes para la reparación y/o regeneración de los tejidos debido a la producción de colágeno, la mitosis, la diferenciación celular y la angiogénesis (Monteiro de Castro Neves, 2008; Flores y col., 2011; Vanat y col., 2012; Cho-Hee y col., 2016). Durante el tratamiento y post-tratamiento no se observaron signos de rechazo a la terapia ni respuesta inflamatoria.

4. Análisis de sangre

Se realizó un conteo de PLT en hemograma completo y en cada muestra de PRP y PPP para evaluar si se concentró PLT (ver anexo 3). Todos los animales estaban clínicamente sanos al inicio del tratamiento. A los casos tratados con medicina regenerativa se les hizo un hemograma y todos resultaron en valores de PLT normales. Ningún paciente padecía de alguna patología clínica. En cuanto al recuento de PLT en PRP y PPP, solamente el caso 3, 4 y 6 mostraron un número mayor de PLT en PRP comparado con el valor de su hemograma en particular, no correspondiendo con la bibliografía de que el PRP contiene hasta 4 veces más la concentración de PLT, pero sí que éste contiene mayor concentración de PLT. Se cree que las causas pueden haber sido por inviabilidad de la muestra, lisis celular, demora en el acto de la extracción de sangre, uso de

principio activo de validez desconocida o demora en el procesamiento de las muestras. Todos mostraron escaso número de PLT en PPP coincidiendo con lo especificado en la bibliografía (ver anexo 3).

5. Análisis microbiológico

Fueron analizadas 5 muestras de PRP y PPP en agar sangre y PCA de un total de 6 muestras (fig. 21). Ninguna de ellas presentó crecimiento microbiano por lo que nos indicó que fue correcta la manipulación durante el procesamiento de cada muestra.

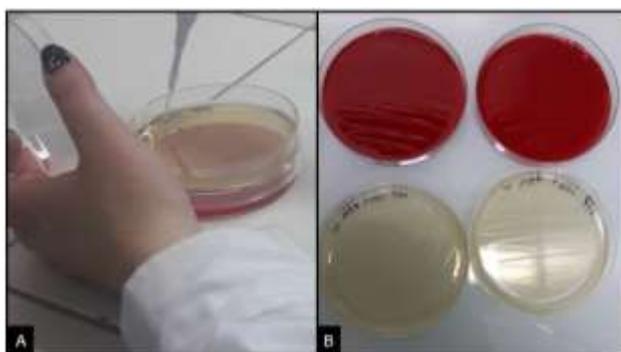


Figura 21: Análisis microbiológico. A) Preparación de la muestra. B) Medio sin crecimiento de microorganismos contaminantes.

DISCUSIÓN

Los datos recopilados del relevamiento de casos clínicos de pacientes con heridas que han frecuentado el hospital de Facultad de Veterinaria (UdelaR) en los últimos 3 años y clínicas privadas en Rivera, nos indicaron que los ingresos por lesiones cutáneas son casos atípicos o prácticamente de rara aparición en la clínica diaria. Esto se atribuye a que el propietario del animal considera innecesario el tratamiento médico de la misma, a no ser que crea que está con infección o clínicamente no ha curado. También se pudo revisar que las etiologías más comunes mencionadas por los médicos veterinarios fueron por causas como politraumatismo de diversa índole y mordeduras entre perros.

La cicatrización de las heridas se evaluó por el tiempo que tardaron en completar la epitelización y por el grado de reducción de tamaño en el tiempo tal como lo menciona Gutiérrez y col. (2005) en su trabajo. Si bien la evaluación tuvo ciertas dificultades debido a la forma irregular con la que se tomaron las fotografías, no

permitiendo comparar de una forma cuantitativamente exacta la cicatrización en los grupos, se pudo determinar la tasa de contracción (TC) en todos los casos de estudio. Esta TC se determinó por medio del programa ImageJ que adaptó las fotografías en una misma escala y permitió estimar subjetivamente el cálculo del perímetro, el área y la TC de cada herida en particular. La valoración macroscópica de la cicatrización también se basó en la observación clínica y apreciación empírica de las fotografías seriadas.

Los pacientes en su totalidad estaban sanos al inicio y se comprobó por un examen clínico general y un análisis de hemática sanguínea (hemograma completo) elaborado por el veterinario previamente al comienzo del tratamiento. La evolución clínica de los pacientes y la efectividad del uso de PRP y PF en la reparación y regeneración de las heridas cutáneas fue buena y justificada con el avance en la cicatrización de las mismas. Los caninos tratados con medicina regenerativa evidenciaron exitosamente una aceleración en la cicatrización de la herida, con una TC destacada macroscópicamente entre la primera y la segunda semana de tratamiento (fig. 20). Mostraron una contracción de la lesión cutánea mayor al 40%, excepto el caso 1. Una de las causas por la que se sospechó que no hubo una rápida aceleración en el caso 1 durante la primera semana fue debido a una aplicación deficiente de PRP y PF, falta de experiencia por parte del autor durante la aplicación, mala preparación del material o demora en la aplicación del tratamiento medicina regenerativa ya que fue la primera vez. A partir de la tercera semana se pudo observar que el tratamiento con medicina regenerativa no resultó tan notable en comparación con las primeras dos semanas. Su progreso fue constante durante el paso del tiempo.

Los pacientes no presentaron evidencia de rechazo, ni tampoco hubo respuesta inflamatoria local o sistémica coincidiendo con lo estipulado por los autores Kim y col., 2009 que, también utilizaron PRP en caninos y no vieron signos adversos. Cabe destacar que, en el caso 3 se observó tejido de granulación exuberante que no se debe confundir con inflamación. Ninguno de los grupos requirió sedación del paciente y fueron tratamientos mínimamente invasivos, no siendo perjudicial ni molesto para el animal (Filardo y col., 2011). La mayor ventaja con este nuevo tratamiento en base a PRP y PF, fue acelerar el proceso de cicatrización puesto que el PRP es una rica fuente de FC que son importantes para la reparación y/o regeneración de los tejidos debido a la producción de colágeno, la mitosis, la diferenciación celular y la angiogénesis (Monteiro de Castro Neves, 2008; Flores y col., 2011; Vanat y col., 2012; Cho-Hee y col., 2016). Además, PRP tiene funciones como un factor quimiotáctico para células de músculo liso, fibroblastos, macrófagos, leucocitos y células progenitoras mesenquimales (Kim y col., 2009).

En el recuento de PLT en PRP y PPP sólo 3 casos coincidieron con la bibliografía en cuanto a que el PRP contiene elevada concentración de PLT. Sin embargo,

no se constató que las PLT concentraran 4 veces más, pero dieron resultados por encima del valor umbral. Se cree que las causas más relevantes pudieron haber sido por inviabilidad de la muestra debido a la baja calidad, lisis celular, demora en la extracción y/o procesamiento de la sangre que tiende a acentuar la agregación plaquetaria. Otras causas también posibles pudieron haber sido el uso del anticoagulante de validez desconocida, la manipulación incorrecta de la muestra durante el proceso y las patologías que cursen con trombocitopenia también pueden hacer que se anule o se rechace la muestra (Meyer y col., 2007).

Las muestras cultivadas microbiológicamente en agar sangre y PCA no tuvieron crecimiento de microorganismos contaminantes por lo que se verificó que la manipulación durante la preparación del PRP y PPP fue correcta y no hubo contaminación. A pesar de ello, las heridas de los animales no requerían material esterilizado puesto que en su totalidad eran heridas sucias-contaminadas. Solamente en el caso 4, no se pudo realizar el cultivo debido a una falla de coordinación de horarios, independientemente las muestras cumplieron su propósito en la clínica mostrando evolución en la cicatrización del caso en particular.

Indiscutiblemente, en este trabajo de estudio, los resultados obtenidos fueron satisfactorios gracias a la considerable reducción de cicatrización de las heridas estudiadas (fig. 20). A pesar de las diferencias de tratamiento (tradicional o medicina regenerativa), a la forma de aplicación, a la cantidad y el tipo de lesiones, existe un punto de convergencia entre las hipótesis de los distintos autores y del presente estudio. Ambos plantean y comprueban el efecto beneficioso del uso del PRP y PF, y los resultados lo confirman, dado que existió una recuperación favorable del paciente independiente del recuento celular (PLT).

A pesar de que ambos tratamientos mostraron progreso en la cicatrización de las heridas, se sigue manteniendo la idea que el tratamiento con medicina regenerativa es más ventajoso puesto que al concentrar más PLT, estamos concentrando más FC, los cuales son importantes para la regeneración y reparación de las lesiones cutáneas. Sin embargo, en este estudio no se pudo concentrar en gran volumen las PLT aunque sí –concentraron, entonces se cree que la mejor evolución lo tuvo el grupo medicina regenerativa por tal motivo. En el grupo control, además, se limpiaba la herida día por medio, a veces la limpieza puede afectar la reparación de heridas si con ello se ‘barre’ la fina capa de células epiteliales que está proliferando.

CONCLUSIONES

El uso de PRP perilesional y aplicación de PF sobre la herida, ambos de carácter

autólogo, es seguro. Los pacientes tratados con medicina regenerativa mostraron exitosamente un progreso en la cicatrización. Por otro lado, no menos importante, los animales tratados con enrofloxacin también evidenciaron cicatrización de la herida, sin embargo, su cierre fue más retardado en el tiempo. La medición de la reducción del tamaño (TC) no fue fácil de determinar por la forma irregular que se tomaron las fotografías, pero se adaptó al programa ImageJ el cual calculó perímetro, área y TC de las heridas. No se pudo confirmar que el PRP contenga hasta 4 veces más PLT, pero en 3 de los casos fue posible concentrar más PLT comparado con la cantidad de las mismas en el hemograma del paciente. Todos mostraron recuento bajo de PLT en PPP confirmando lo mencionado en las bibliografías.

El PRP y PF constituyen una opción terapéutica prometedora para el manejo de heridas en *Canis familiaris*. Además de ser una fuente de elementos favorables para la cicatrización, es un método económico y de fácil obtención y aplicación en la clínica de pequeños animales que no ha mostrado signos de rechazo frente a las repetidas aplicaciones. Nuevas investigaciones deben ser llevadas a cabo para evidenciar la participación de FC de PLT en la regeneración cutánea en casos de las heridas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akita, S., Akino, K., Hirano, A. (2013). Basic fibroblast growth factor in scarless wound healing. *Advances in wound care*, 2(2), 44-49.
2. Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A.T. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis* 91:4-15.
3. Anitua, E., Andía, I., Sanchez, M., Azofra, J., Zaldueño, M.M., Fuente, M., Nurden, P., Nurden, A.T. (2005). Autologous preparation rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of Orthopaedic Research* 23:281-286.
4. Barbosa, A., Del Carlo, R.J., Gomes, H.C., Olivera, A.C., Monteiro, B.S., Del Carlo, B.N. (2008). Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 5, pp. 1335-1340.
5. Bauer, J.A., Correa, L., Lima, F.L.M., Lima, LAPA, Pustiglioni, F.E. (2009). Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos. *Rev. Periodontia*, 19(3), 98-108.
6. Bennett, N.T. y Schultz, G.S. (1993). Growth factors and wound healing. Part II. Role in normal and chronic woundhealing. *Am. J. Surg.* 166:74-81
7. Carmona, J.U., López, C., Prades, M. (2009). Use of autologous platelet concentrates obtained by the tube method as a treatment for arthropathies in horses. *Arch. Med. Vet.* 41:175-179.
8. Carmona, J.U., López, C. (2011). Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(9), 506-510.
9. Carter, C.A., Jolly, D.G., Worden, C.E., Hendren, D.G., Kane, C.J. (2003). Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 74:244-255
10. Clark, R. (2003). Fibrin glue for wound repair: facts and fancy. *Thromb Haemost*; 90 (6):1003 -1006.
11. Crovetti, G., Martinelli, G., Issi, M. (2004) Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfusion and Apheresis Science* 30:145-151.
12. Degreef, H.J. (1998). How to heal a wound fast. *Dermatologic clinics*, 16(2):365-375.
13. DeRossi, R., Coelho, ACADO., Mello, G.S.D., Frazílio, F.O., Leal, C.R.B., Facco, G.G., Brum, K.B. (2009). Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta cirúrgica brasileira*, 24(4), 276-281.
14. Dusse, L.M.S., Macedo, A.P., Batschauer, A.P., Carvalho, M.G. (2008). Plasma rico em plaquetas e sua aplicacao em odontologia. *Rev. Bras. De Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, pp. 193-197.
15. Garcez, T.N.A (2012). Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvantes da cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos Nova Zelândia. Tesis de maestría. Faculdade de

- Veterinária Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
16. Guarín-Corredor, C., Quiroga-Santamaría, P., Landínez-Parra, N.S. (2013). Wound healing process of skin, endogenous fields related and chronic wounds. *Rev. de la Fac. de Med.* 61(4), 441-448.
 17. Hartwig, J., Italiano, J. 2003. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 1, 1580-1586.
 18. Huang, L., Burd, A. (2012). An update review of stem cells application in burns and wound care. *Indian J Plast Surg*; 45 (2):229-236.
 19. Italiano, J. E., Shivdasani, R. A. (2003). Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(6), 1174-118.
 20. Johnson, L.N., Winter, K.M., Reid, S., Hartkopf-Theis, T., Marks, D.C. (2011). Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution. *Cryobiology* 62:100-106.
 21. Juncosa, S., Sanjuán, J.J.A., Sanjuán, A.A. (2009). Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales (No. V643 SOPm). Ed. Servet, pp. 61-80.
 22. Kim, H., Choi, K., Kweon, O., Kim, W.H. (2012). Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. *J Dermatol Sci*; 68(3):149-156.
 23. Kim, J.H., Park, C., Park, H.M. (2009). Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol* 20:123-126.
 24. Kliche, S., Waltenberg, J. (2001). VEGF receptor signaling and endothelial function- *IUBMB Life* 52:61-66.
 25. Larrimer, N.R., Balcerzak, S.P., Metz, E.N., Lee, R.E. (1970). *Am. J. MmED. sci*, 259:242-256
 26. Lotfi, A., Malekzadeh, S. (2011). Effects of platelet-rich plasma on cutaneous regeneration and wound healing in dogs treated with dexamethasone. *Comp Clin Pathol* 20: 155-162.
 27. Mannaioni, P.F., Di Bello, M.G., Masini, E. (1997). Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflammation Research*, 46(1), 4-18.
 28. Mankad, P.S. (2001). The role of fibrin sealants in hemostasis. *The American journal of surgery*, 182(2), S21-S28.
 29. Merlini, N.B., Fonzar, J.F., Perches, C.S., Sereno, M.G., Souza, V.L., Estanislau, C.A., Rodas, N.R., Ranzani, J.J.T., Maia, L., Padovani, C.R., Brandao, C.V.S. (2014). Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arquivo Brasileiro de Med. Vet. e Zootecnia*, 1742-1750.
 30. Mondino, A., Campbell, V. (2015). Tratamiento regenerativo en la reparación de heridas cutáneas en un modelo murino. Tesis de grado de Facultad de Veterinaria, UdelaR.
 31. Mondino, A., Yaneselli, K., Mirazo, J., Ferreira, O., Maisonnave, J. (2016). Aplicación exitosa de PRP y parches de fibrina en un caso clínico de un equino deportivo. *Veterinaria (Montevideo)*, artículo en prensa.

32. Monteiro de Castro Neves (2008). O uso do Plasma Rico em Plaquetas no tratamento de tendinopatias. *Brazilian Journal of Equine Medicine* 19: 26-35
33. Moreno, R., Carreño, M.G., Torres, J.J., Alonso, J.M., Villimar, A., López Sánchez, P. (2015). Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora.
34. Murga, F.J. (2003). Empleo del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea de alvéolos dentarios post-exodoncia. Tesis para el título Profesional de Cirujano-dentista, Fac. Odontología, Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima - Perú
35. Obarrio, J.J., Ara/uacutez-Dutari, J.I., Chamberlain, T.M., Croston, A. (2000). The use of autologous growth factor in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology-case reports. *International Journal of Periodontics/Restorative Dentistry*, v. 20, n. 5, pp. 487-497.
36. Oliva, M.A. (2008). Exposição a fatores de crescimento e proteínas típicas a plasma rico de plaquetas inibe a formação de nódulos de mineralização de culturas de células crescidas sobre titânio. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Odontologia Ribeirão Preto, 76 f.
37. Paes-Leme, F.O., Wurzinger, L.J., Vasconcelos, A.C., Alves, G.E.S. (2006). Ativação de plaquetas de eqüinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arq Bras Med Vet Zootec* 58, 149-157
38. Pavletic, M.M. (2011). Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery.
39. Pelagalli, A., Belisario, M.A., Tafuri, S., Lombardi, P., d'Angelo, D., Avallone, L., Staiano, N. (2003). Adhesive properties from different animal species. *J Comp Pathol* 128, 127-131
40. Ramasastry, S.S. (2005). Acute wounds. *Clin Plast Surg*. 32:195–208.
41. Reyes, M., Montero, S., Cifuentes, J., Zarzar, E. (2002). Actualización de la técnica de obtención y uso del plasma rico en factores de crecimiento. *Rev Dental de Chile* 93(2):25-28.
42. Robson, M.C. (2001). The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 5:12-17.
43. Sánchez, M.J., Azofra, E., Anitua, I., Andia, S., Padilla, J., Santisteban, I., Mujika (2003). Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Scien Sports Exer* 35:1648-1652.
44. Scalfani, A.P., Romo III, D., Ukrainsky, G., McCormick, S.A., Litner, J., Kevy, S.V., Jacobson, M.S. (2005). Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. *Archives of Facial Plastic Surgery* 7:163-69.
45. Schumacher, J., Ford, T.S., Brumbaugh, G.W., Honnas, C.M. (1996). Viability of split-thickness skin grafts attached with fibrin glue. *The Canadian Veterinary Journal* 60:158-69.

46. Scott, M., Erasmo, A., Lopez, D.Y., Danilkovitch-Miagkova, A., LeRoux, M.A. (2012). Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Translational Medicine* 1:142–149.
47. Stashak, T., Theoret, C.L. (2008). *Equine Wound Management*. 2a edición, Ed. Black Well Publishing. pp 225 -235.
48. Tae-Min You, Byung-Ho Choi, DDS, PhD, Jingxu Li, DDS, Jae-Hyung Juan, DDS Hyeon-Jung Lee, DDS, Seourg-Ho Lee, DDS, PhD, Seung-Mi Jeong, Seoul South Korea (2007). The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103:e8-e12
49. Textor, J.A., Willits, N.H., Tablin, F. (2013). Synovial fluid growth factor and cytokine concentrations after intra-articular injection of a platelet-rich product in horses. *Vet J*; 198:217-223.
50. Tridick, R. T., Warner, E. D. (1994). Fibrin fixation of skin transplants. *Surgery* 15:90-95.
51. Vanat, N., Da Silva Medeiros, T.N., Stipp Balarin, M.R., Pereira, P., De Biasi, F. (2012). Technique modification for platelet rich plasma prepare in dogs. *Ciencias Agrarias, Londrina*, v. 33, n. 1, pp. 313-322.
52. Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
53. Vendramin, F., Franco, D., Schamall, R., Franco, T. (2001). Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 25(1), 4-10.
54. Viegas, C.A.A., Dias, J.M., Azevedo, J., Ferreira, A.J., San Roman, F., Cabrita, A.M.S. (2006). A utilização de plasma rico em plaquetas na regeneração do tecido ósseo alveolar e cortical. Estudos experimentais num modelo de defeito ósseo periodontal em cão Beagle (*Canis familiaris*) e num modelo de defeito ósseo cortical na ovelha (*Ovis aries*). *Rev. Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 101, n. 559-60, pp. 193-213.
55. Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., Hitzler, W.E. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, v.34, n.4, p. 665-667.
56. Williad, M.D., Tvedten, H. (2007). *Diagnóstico clínico-patológico práctico*. Ed. Intermédica, pp. 16-114.
57. Wilson, E.M.K., Barbieri, C.H., Mazzer, N. (2006). Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. *Acta Ortopédica Brasileira* 14 (4):208-12.
58. White, J.G. (1998). Platelet membrane receptors: Molecular biology, Immunology, Biochemistry and Pathology” Ed.g.a.Jamieson, PP 1-32, New York.

ANEXOS

Anexo 1: Relevamiento de casos clínicos de heridas del Hospital de Veterinaria, UdelaR.

Nº FICHA/AÑO	SEXO	RAZA	EDAD	MOTIVO CONSULTA	TRATAMIENTO
45467/14	M	Cruza	4 años	Politraumatizado	Amoxicilina
45436/14	H	Cruza	4 años	Politraumatizado	Suero fisiológico
45203/14	M	Pitbull	1 año	Politraumatizado	Suero fisiológico Tramadol Dexametasona
45890/14	H	Rottweiler	9 años	Politraumatizado – Herida infectada en miembro anterior derecho (MAD)	Amoxicilina oral c/12hrs Higiene con yodo c/12hrs Collar isabelino
45832/14	H	Cruza	3 años	Mordida por otro perro – Herida en cuello con contenido sanguinolento	Amoxicilina 500mg c/8hrs 1 comprimido durante 7 a 10 días
45744/14	M	Cruza	3 años	Herida (orificio) en entrepierna	Enrofloxacina
45353/14	M	Cruza	2 años	Mordido en testículos por otros perros – Herida testicular con secreción purulenta	Lavado con suero fisiológico Tramadol i/v Ampicilina i/v
45308/14	H	Cruza	8 años	Mordido por otro perro – Herida en cuello con corrimiento purulento	Lavado de herida con clorhexidina Clavamox 250mg, 3 comp c/12hrs
45146/14	M	Cruza	9 meses	Mordido – Herida en nariz	Cefradina
45136/14	H	Cimarrón	-	Corte en cuello	Lavado de herida Clavamox
45018/14	M	Pitbull	1 año	Mordido por otro perro – Lesiones en belfos y región supraorbital derecha con secreción purulenta	Lavado de herida Clavamox Amoxicilina
44913/14	M	Cruza	7 años	Lesión en pata que no cicatriza – Corte en almohadilla plantar sin exudado	Lavado y antibiótico
45061/14	H	Cruza	9 años	Mordida por otro perro	Lavado de herida Amoxicilina
44746/14	M	Rottweiler		Pelea con otro perro – Herida en cuello con tejido necrótico y tejido fistuloso	Desbridamiento quirúrgico Colocación de drenaje Control
44613/13	M	Cruza	14 años	Herida en piel sobre tumoración al lado de testículo	PAAF (punción aspiración con aguja fina) Amoxicilina hasta resultado de PAAF
44565/13	H	Cruza	9 años	Pelea con otro perro - Herida en cuello y zona inguinal	Clavamox
44201/13	H	Cruza	7 años	Herida desgarrante en abdomen	Antibiótico

44146/13	M	Cruza	2 años	Soluciones de continuidad en miembro anterior izquierdo (MAI) edematizada – no apoya	Clavamox 1cm s/c Lavado de herida
43925/13	H	Pitbull	3 años	Herida por mordida en MAD	Tramadol fisiológico Ampicilina Lavado de herida
43798/13	H	Cruza	1 año	Politraumatizada – Fractura MAD y heridas en piel en MAD	Vendaje de protección de hueso expuesto Amoxidal plus

Anexo 2: Relevamiento sobre casos clínicos de heridas en la especie canina en veterinarias de Rivera.

Comentado [UdW1]: Sería importante que aquí o en Materiales y Metodos pongas cuantos casos fueron relevados en Rivera y cuantos en Hosp F Vet, ambos en 3 años?

Encuesta n°1

Nombre de la Veterinaria o Veterinario/a:

Veterinaria El Arriero

Ciudad: Rivera

Fecha: 31/05/17

Preguntas:

1- ¿Son frecuentes heridas en perros como casos clínicos?

Son bastante frecuentes

2- ¿Cuáles son los tipos de heridas más vistos?

LIMPIA	LIMPIA CONTAMINADA	CONTAMINADA	SUCIA
		x	

ABIERTA	CERRADA	SIMPLES	COMPLICADAS	MECÁNICAS	QUEMADURAS
				x	

OTROS

X

3- ¿Cuál/es son la/s ubicación/es de la/s herida/s?

Cuello y tórax

4- ¿Cuáles son las causas de la lesión según el agente traumático?

Mordeduras de otros perros o lesiones de jabalí

5- ¿Cuáles tratamientos son empleados? ¿Tiempo de duración?

Dependiendo el tiempo transcurrido sutura o solo limpieza para que cure por segunda intención. Tiempos depende extensión de las heridas.

6- Cuidados a tener en cuenta:

Buena higiene y en casos de sutura cuidados para que no se saquen los puntos.

7- ¿Cuáles pacientes son más susceptibles a padecer de heridas? ¿Enteros o castrados?

Enteros

8- ¿Te parece que son pocos los casos clínicos de lesiones cutáneas que llegan a la clínica?

Sí	No
X	

¿Si está de acuerdo que en la clínica no llegan muchos casos de lesiones cutáneas, puedes mencionar tu opinión mencionando el por qué? Porque muchas veces las heridas no tienen infección y, por tanto, no van a consulta.

Encuesta n° 2:

Nombre de la Veterinaria o Veterinario/a:

Judith Artigas

Ciudad: Montevideo

Fecha: 2/6/2016

Preguntas:

1- ¿Son frecuentes heridas en perros como casos clínicos?

Son pocos los casos de heridas con los que me he encontrado.

2- ¿Cuáles son los tipos de heridas más vistos?

LIMPIA	LIMPIA CONTAMINADA	CONTAMINADA	SUCIA
		x	

ABIERTA	CERRADA	SIMPLES	COMPLICADAS	MECÁNICAS	QUEMADURAS
x			x		

OTROS
X

3- ¿Cuál/es son la/s ubicación/es de la/s herida/s?

En todo el cuerpo

4- ¿Cuáles son las causas de la lesión según el agente traumático?

Generalmente debido a mordeduras entre perros.

5- ¿Cuáles tratamientos son empleados? ¿Tiempo de duración?

- Limpieza con agua oxigenada con iodofón.
- Sutura si es posible.
- Antibióticos: Penicilina estreptomocina, cefalosporina, amoxicilina con ácido clavulánico o cefalexina + amoxicilina. Duración entre 5 a 7 días.

6- Cuidados a tener en cuenta:

Cuidar contaminación de la herida.

7- ¿Cuáles pacientes son más susceptibles a padecer de heridas? ¿Enteros o castrados?

Sin distinción de sexo.

8- ¿Te parece que son pocos los casos clínicos de lesiones cutáneas que llegan a la clínica?

Sí	No
x	

¿Si está de acuerdo que en la clínica no llegan muchos casos de lesiones cutáneas, puedes mencionar tu opinión mencionando el por qué? Porque supongo el propietario no cree que sea necesario el tratamiento de una herida.

Encuesta n°3:

Nombre de la Veterinaria o Veterinario/a:

Santiago Varela

Ciudad: Rivera

Fecha: 12/12/16

Preguntas:

1- ¿Son frecuentes heridas en perros como casos clínicos?

Muy poco frecuentes

2- ¿Cuáles son los tipos de heridas más vistos?

LIMPIA	LIMPIA CONTAMINADA	CONTAMINADA	SUCIA
		x	

SIMPLES	COMPLICADAS	MECÁNICAS	QUEMADURAS
X		X	

OTROS
X

3- ¿Cuál/es son la/s ubicación/es de la/s herida/s?

Miembros, cuello, tórax, abdomen

4- ¿Cuáles son las causas de la lesión según el agente traumático?

Politrauma, mordeduras, peleas con otros perros

5- ¿Cuáles tratamientos son empleados? ¿Tiempo de duración?

Lavar herida con suero fisiológico y aplicar un spray cicatrizante. No dejar que se lama la zona. Tratar con enrofloxacin, amoxicilina por 7 días. En caso de ser necesario, se extiende el tratamiento.

6- Cuidados a tener en cuenta:

No lamer zona de la herida.
Cuidar contaminación.

7- ¿Cuáles pacientes son más susceptibles a padecer de heridas? ¿Enteros o castrados?

Sin distinción de edad ni sexo.

8- ¿Te parece que son pocos los casos clínicos de lesiones cutáneas que llegan a la clínica?

Sí	No
x	

¿Si está de acuerdo que en la clínica no llegan muchos casos de lesiones cutáneas, puedes mencionar tu opinión mencionando el por qué? Porque creo que el dueño cree poder tratarla, a no ser que tenga infección.

Encuesta n° 4:

Nombre de la Veterinaria o Veterinario/a:

Mundo Pet

Ciudad: Rivera

Fecha: 18/8/16

Preguntas:

1- ¿Son frecuentes heridas en perros como casos clínicos?

Sí

2- ¿Cuáles son los tipos de heridas más vistos?

LIMPIA	LIMPIA CONTAMINADA	CONTAMINADA	SUCIA		
		X			
ABIERTA	CERRADA	SIMPLES	COMPLICADAS	MECÁNICAS	QUEMADURAS
x			X	X	

OTROS
x

3- ¿Cuál/es son la/s ubicación/es de la/s herida/s?

Por todo el cuerpo

4- ¿Cuáles son las causas de la lesión según el agente traumático?

Generalmente llegan heridas por causa de mordidas o accidente de tránsito

5- ¿Cuáles tratamientos son empleados? ¿Tiempo de duración?

Lavado de herida y posterior antibioticoterapia

6- Cuidados a tener en cuenta:

No lamerse
Lavados

7- ¿Cuáles pacientes son más susceptibles a padecer de heridas? ¿Enteros o castrados?

Cualquiera

8- ¿Te parece que son pocos los casos clínicos de lesiones cutáneas que llegan a la clínica?

Sí	No
x	

¿Si está de acuerdo que en la clínica no llegan muchos casos de lesiones cutáneas, puedes mencionar tu opinión mencionando el por qué? El dueño de la mascota debe considerar innecesario llevarlo a la clínica.

Encuesta n° 5:

Nombre de la Veterinaria o Veterinario/a:

Clinicao

Ciudad: Rivera

Fecha: 14/12/2016

Preguntas:

1- ¿Son frecuentes heridas en perros como casos clínicos?

Sí.

2- ¿Cuáles son los tipos de heridas más vistos?

LIMPIA	LIMPIA CONTAMINADA	CONTAMINADA	SUCIA
		x	

ABIERTA	CERRADA	SIMPLES	COMPLICADAS	MECÁNICAS	QUEMADURAS
x			x		

OTROS
X

3- ¿Cuál/es son la/s ubicación/es de la/s herida/s?

Cabeza, miembros

4- ¿Cuáles son las causas de la lesión según el agente traumático?

Mordedura

5- ¿Cuáles tratamientos son empleados? ¿Tiempo de duración?

Antibioticoterapia: amoxicilina o enrofloxacina

6- Cuidados a tener en cuenta:

Limpieza de la herida 2 veces por día con yodofón y aplicación de spray cicatrizante

7- ¿Cuáles pacientes son más susceptibles a padecer de heridas? ¿Enteros o castrados?

Perros enteros

Anexo 3: Análisis de sangre para hemograma, PLT en PRP y PPP de los casos clínicos de heridas.

Caso	Nombre	Eritrocitos	Leucocitos	Plaquetas	PLT en PRP	PLT en PRP
1	Sol	4,78x10 ¹² /L	7,8x10 ⁹ /L	382x10 ⁹ /L	27x10 ⁹ /L	25x10 ⁹ /L
2	Negrita	6,62x10 ¹² /L	16,8x10 ⁹ /L	153x10 ⁹ /L	39x10 ⁹ /L	17x10 ⁹ /L
3	Patita	7,02 x10 ¹² /L	8,7x10 ⁹ /L	145x10 ⁹ /L	163x10 ⁹ /L	34x10 ⁹ /L
4	Luna	10x10 ¹² /L	16x10 ⁹ /L	254x10 ⁹ /L	593x10 ⁹ /L	11x10 ⁹ /L
5	Ron	8,33x10 ¹² /L	7,9x10 ⁹ /L	135x10 ⁹ /L	115x10 ⁹ /L	25x10 ⁹ /L
6	Ángel	6,64x10 ⁹ /L	14x10 ⁹ /L	132x10 ⁹ /L	187x10 ⁹ /L	14x10 ⁹ /L
7	Amarelinho			No se realizó		
8	Peludinho			No se realizó		