

## P. René van Weeren DVM PhD Dipl ECVS

(Departamento de Ciencias Equinas, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Utrecht, Países Bajos)

Trabajo presentado en el CICADE 2003, AGOSTO 22-26. CURITIBA, PARANÁ, BRASIL.

### Introducción

Heridas son problemas comunes para el médico veterinario trabajando en equinos. No es siempre fácil tratarlas, menos cuando la sutura *per primam* falta, o cuando no se puede intentar la sutures

*per primam*

por la naturaleza de la herida. En estos casos la herida tiene que curar por medio del proceso llamada

*per secundam*

. Este proceso es un proceso lento que puede traer consigo muchas complicaciones. El resultado final no siempre es bonito estéticamente y hasta puede impedir un buen funcionamiento del caballo.

Las investigaciones en esta área han sido limitadas durante muchos años. Sin embargo, más reciente algunos trabajos de investigación fundamental han sido realizados. Este manuscrito presenta un sumario breve de esas investigaciones, después de una introducción sobre el proceso de cura de heridas en general.

### ***El proceso de cura de heridas***

Clásicamente se ha dividido este proceso en 4 fases: la fase inflamatoria inmediatamente después del trauma, la fase de granulación, la fase de contracción de la herida, y finalmente la fase de epitelialización. Se debe entender que esta división es una división un poco artificial que no se puede tomar demasiado estrictamente. En realidad, las transiciones entre las fases no son muy bien definidas y es normal que la siguiente fase comienza cuando la fase anterior no ha terminado todavía. Además, no todas las áreas de una misma herida se deben encontrar en la misma fase. En principio, esta división en 4 fases se aplica al proceso *per primam* como al proceso *per secundam*. Sin embargo en

el último caso las fases son mucho más evidentes. Por eso, y porque la cura de heridas *primam* generalmente no presenta problemas, este manuscrito trata del proceso *per secundam* solamente

### - La fase inflamatoria

Después del trauma que ha quebrado la integridad del tejido, sucede hemorragia y extravasación de constituyentes de sangre y agregación de trombocitos. Los trombocitos inician la cascada de la coagulación, pero también producen una gran cantidad de sustancias biológicamente activas (Clark 1985, Cotran *et al.* 1994) de los cuales Tumour Necrosis Factor- (TNF- $\alpha$ ) es uno de los más importantes. El estímulo inflamatorio produce un flujo de leucocitos polimorfonucleares (PMN's ) y de macrófagos. La función más importante de los PMN's es la captura de bacterias por medio del proceso de fagocitosis y después la eliminación de los mismos, principalmente por la producción de especies de oxígeno reactivos ( *reactive oxygen species, ROS* ). Este mecanismo es uno de los mecanismos bactericidas más importantes. Además, los PMN's ayudan con la degradación de los tejidos que ya no son viables como hacen también los macrófagos. Estos últimos además producen una gran cantidad de citokinas y factores de crecimiento, tal como interleukinas 1, 6 y 8 (Il-1,6,8), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblastlike Growth Factor (FGF), Epithelial Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ), y Insulin-like Growth Factor (IGF) (Moulin 1995). La figura 1 es una representación esquemática de una herida en la fase inflamatoria.

### - La fase de granulación

Muy pronto después de la reacción inflamatoria inicial, los fibroblastos comienzan su migración hacia el área afectada Ellos son atraídos por una serie de factores de crecimiento que son producidos en la herida como hemos visto antes. Los más importantes son en este sentido PDGF, FGF y TGF- $\beta$ . Estos, y otros factores de crecimiento tales como FGF e IGF estimulan la mitosis de los fibroblastos después de la llegada de ellos en la herida. Los fibroblastos son esenciales para la producción de los materiales de reparación de la matriz extracelular (*extracellul*

*ar matrix, ECM*

) y para la angiogenesis. Estas células producen TGF- $\beta$  y PDGF y de este modo crean un “

*feedback loop*

” autocrina. La proliferación de ellas es estimulada por una tensión de oxígeno baja, una condición normal en los sitios profundos de la herida donde la circulación está comprometida. Es sobretodo TGF- $\beta$  que tiene un papel crucial en la formación de la ECM nueva porque este factor es capaz de aumentar la síntesis de la ECM y de inhibir la degradación de la misma (Shah

*et al.*

1995).

La primera nueva ECM es un tejido provisional, que reemplaza la sangre coagulada, consistiendo principalmente de fibronectina y ácido hialurónico. Esta ECM inmadura es destituida después por un tejido más maduro que tiene proteoglicanos y fascículos de colágeno tipo I como componentes principales. Entretanto, los fibroblastos cambian de un fenotipo proliferativo para un fenotipo que es más que todo productor de componentes de ECM. Más tarde otro cambio se produce: los fibroblastos producen elementos contráctiles y se vuelven miofibroblastos que tienen un papel esencial en la fase de contracción. Granulación en equinos es un proceso extremadamente rápido, mucho más rápido que en otras especies (Chvapil *et al.* 1979). Tal vez es por eso que el problema de hipergranulación o formación de *caro luxurians*

es un problema típico de los equinos.

### - *La fase de contracción*

En la fase de contracción los fibroblastos, que se han transformado en miofibroblastos produciendo elementos filamentos de actino como elementos contráctiles, se ponen en orden (fig. 2), y se conectan los unos a los otros y a las márgenes de la herida. Esa acción coordinada produce el movimiento de las márgenes de la herida hacia el centro de la misma de forma que se cierre parcialmente el defecto original, dejando un defecto mucho más pequeño para ser cubierto con epitelio después. Es TGF- $\beta$  que estimula muy efectivamente esta contracción por medio del efecto positivo de este factor de crecimiento en la proliferación de los fibroblastos, en la transformación de estos en miofibroblastos, y en la producción de actino. Al contrario, los mediadores anti-inflamatorios como TNF- $\alpha$ , Il-1, Il-6, pero también las prostaglandinas, tienen un efecto negativo en este proceso.

Hay una diferencia muy grande entre humanos y caballos con respecto a la contracción de heridas. La piel floja de los caballos permite una contracción substancial que es, por eso, visto como un aspecto muy positivo en el proceso de la cura de heridas. En el ser humano la piel esta muy fijamente conectada con los tejidos debajo de la piel. En este caso la piel no puede hacer grandes excursiones y una contracción considerable resultará en la formación de contracturas significantes. Estas son no solamente feas, pero también impiden el buen funcionamiento lo que en muchos casos necesita una intervención quirúrgica (Shah *et al.* 1994).

### - *La fase de epitelialización*

Es la última fase del proceso de la cura de heridas. Es un procedimiento lento. En el caballo se estima que el epitelio hace un progreso de 1 mm en 10 días (Stashak 1991). El proceso es estimulado por EGF e IGF. TGF- $\beta$  tiene un efecto estimulante en la migración de las células epitelicas, pero limita la proliferación de estas. Esas acciones significan que el papel de TGF- $\beta$  es más importante en las fases iniciales del proceso de cura de heridas que en la última fase. Productos tóxicos, que son producidos por leucocitos que pueden permanecer presentes si persiste una inflamación crónica, pueden influenciar negativamente el proceso de la epitelialización.

Después de la terminación del proceso de epitelialización, los procesos de remodelación continúan por un período prolongado en los tejidos recientemente formados. Uno puede decir que una herida en un miembro de un caballo no tiene su forma definitiva hasta un año después de cerrar por completo.

### ***Investigaciones recientes en el campo de heridas de equinos***

Aunque sea verdad que las heridas suelen formar un gran problema para el médico veterinario practicante con equinos por la producción de hipergranulación, la formación de secuestros, o de keloidos feos, hasta ahora las investigaciones fundamentales en esta área han sido extremadamente limitadas. La mayoría de las investigaciones se han dedicado al efecto de la aplicación de medicamentos locales en heridas artificiales y muy superficiales que no se pueden considerar representativas para la situación clínica. Hay muy poco estudios que abordan el asunto más de forma profunda, tal como el estudio de Jacobs *et al.* (1984), quienes han estudiado de forma sistemática el proceso de cura de heridas en equinos en los niveles macroscópicos y histológicos.

Aparentemente hay diferencias en la forma de sanar entre heridas en varias partes del cuerpo (Knottenbelt 1997). Otro hallazgo interesante era que pareciera que los ponis tuvieran mejor tendencia para sanar que los caballos (Bertone *et al.* 1985). Este fue un hallazgo accidental que, sin embargo, correspondía bien con las impresiones clínicas de muchos veterinarios. Fue un hallazgo con gran valor potencial porque, si de verdad existiera tal diferencia intra-especies, pudiera ser de gran ayuda para identificar los puntos problemas y limitaciones del proceso de cura de heridas en el equino. Por esa razón J. M. Wilmink DVM inició un proyecto de investigación fundamental para verificar si se podría comprobar científicamente esa diferencia presunta, y, si fuera así, para analizar las causas de tal diferencia.

### - *Las diferencias entre ponis y caballos (casos clínicos)*

En un estudio retrospectivo con referencia a 442 caballos y 89 ponis que fueron tratados quirúrgicamente por heridas accidentales resultó que los intentos de cerrar las heridas por medio de suturarlas eran significativamente más exitosos en los ponis que en los caballos. Los ponis desarrollaban menos secuestros (4% en contra de 31%) y también se veía menos casos en que la herida se abría totalmente o parcialmente (61% en contra de 76%) (Wilmink *et al.* 2002). Por eso se concluyó que la impresión clínica de que los ponis tienen mejor tendencia a sanar era verdadera.

### - *Las diferencias entre ponis y caballos (trabajo experimental)*

Se inició un experimento en que se hacían heridas estandarizadas en las piernas y en el trunco de un grupo de ponis y un grupo de caballos. Las heridas en las piernas fueron hechos de propósito lo más profundo posible e incluyeron el periostio. En el trunco, se incluyó una parte bastante gruesa del músculo (18 mm). De esta forma las heridas, aunque fueran artificiales, parecían lo más posible las heridas encontradas en la realidad. Se hacía un monitoreo meticuloso del proceso de cura, tanto a un nivel macroscópico, como a un nivel microscópico por medio de biopsias. Resultó que las heridas en el trunco de los ponis sanaron lo más rápido y que las heridas en las piernas de los caballos mostraban un proceso extremadamente lento. Macroscópicamente, la diferencia fue causada principalmente por una diferencia en el proceso de contracción, la cual era mucho más rápido en el poni (Wilmink *et al.* 1999a) (fig. 3). Al nivel microscópico, el número de leucocitos indicó que el proceso inflamatorio en el poni era más

vehemente, pero también más corto que en el caballo. En ese animal el proceso inflamatorio era de baja intensidad y de duración prolongada (Wilmink *et al.* 1999b).

En un otro experimento la posibilidad que las diferencias en contracción originaron de una diferencia genética entre miofibroblastos de ponis y caballos fue investigada. Para comprobar o falsificar esta hipótesis se hacía cultivo de miofibroblastos de ambos tipos de equinos. La capacidad de contracción de las células fue medida utilizando geles de colágeno y también un instrumento que fue desarrollado especialmente para este fin y que podía medir directamente las fuerzas que ejercían las células cultivadas. No era posible demostrar diferencias inherentes entre fibroblastos de ponis y caballos. Por eso, se concluyó que deberían ser diferencias en el medio ambiente de los fibroblastos que los conducían a portarse de una forma diferente (Wilmink *et al.* 2001).

Utilizando información general sobre el proceso de cura de heridas como descrita en los primeros párrafos de este artículo, y la información obtenida por los experimentos descritos, se presumía que fuera probable que diferencias entre las concentraciones de varios mediadores inflamatorios, citokinas y factores de crecimiento quedaron a la base de las diferencias en la fase de contracción. De estos, TGF- $\beta$  parecía el candidato más importante por su papel clave en el proceso de cura de heridas. En un nuevo experimento se podía efectivamente comprobar que las concentraciones de TGF- $\beta$ , tanto de la sustancia total como de la sustancia activa, eran más elevadas en heridas de ponis que en heridas de caballos. Además, se encontró una diferencia entre heridas en el tronco y en las piernas. En las últimas heridas concentraciones altas de TGF- $\beta$  persistían por más tiempo. Este hallazgo es de acuerdo con el proceso más prolongado en este sitio (van den Boom *et al.* 2002).

Porque era de esperar que las diferencias en concentraciones de TGF- $\beta$  fueran causadas por las diferencias en la fase inflamatoria, un nuevo experimento investigó este aspecto. Por medio de implantación de cajas de plástico debajo de la piel (los llamados *tissue chambers* en que se crea un ambiente como dentro de los tejidos pero accesible para sacar muestras) se podía demostrar que los ponis producían más interleukina 1 (uno de los mediadores inflamatorios más potentes) y más sustancias químico-atractivas que los caballos. Además, habían diferencias significativas en la capacidad funcional de los leucocitos (quimiotaxis y producción de ROS). Este estudio confirmó que son principalmente diferencias en las características inflamatorias que determinan las diferencias entre ponis y caballos en la forma de curarse las heridas (Wilmink *et al.*

2003).

### **Conclusión**

Se concluye que hay diferencias importantes y muy significativas entre el proceso de curar de heridas entre ponis y caballos. Estas diferencias presentan una excelente oportunidad para estudiar los elementos claves de este proceso en el equino (y hasta en forma de comparación en otras especies incluyendo el ser humano). Por consiguiente, estas diferencias pueden ofrecer posibilidades para la terapia de caballos con heridas problemáticas encontrados en la práctica.

Se ha probado que el proceso lento y poco eficiente como se puede observar regularmente en las piernas de caballos es causado por una contracción inadecuada. Esta falta en la parte de contracción está relacionada con diferencias en la concentración de TGF- $\beta$  y más precisamente con una concentración baja en la fase aguda de la herida y una concentración que se mantiene a un nivel demasiado alto en las fases más crónicas. En su turno, el nivel de TGF- $\beta$  está relacionado con los niveles de varios mediadores inflamatorios.

Este conocimiento de los aspectos fundamentales del proceso de cura de heridas es esencial cuando uno quiere intervenir en este proceso. No cabe duda que el manejo tradicional de heridas tiene que ser reconsiderado. Por ejemplo, uno puede cuestionar hasta cual punto se debe suprimir la inflamación inicial. En ciertos casos podría ser más ventajoso estimular este proceso. Es probable que en el futuro se puedan realizar intervenciones en todo este proceso de forma mucho más efectiva cuando se toma en cuenta las fases distintas del proceso y los procesos moleculares que quedan a la base de lo mismo. También se debe tomar en cuenta las diferencias entre varios tipos de animales. De esta forma se podrán realizar intervenciones específicas que son deliberadamente adaptadas a la situación individual.

### **Literatura**

Bertone, A.L. Sullins, K.E., Stashak, T.S. and Norrdin, R.W. (1985) Effect of wound location and the use of topical collagen gel on exuberant granulation tissue formation on wound healing in the horse and pony. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 1438-1444.

Chvapil, M., Pfister, T., Escalada, S., Ludwig, J. and Peacock, E.E. (1979) Dynamics of the healing of skin wounds in the horse as compared with the rat. *Exp. Mol. Pathol.*

**30**

, 349-359.

Clark, R.A.F. (1985) Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations I. *J. Am. Acad. Dermatol.*

**5**

, 701-725.

Cotran, S.C., Kumar, V. and Robins, S.L. (1994) Cellular growth and differentiation: normal regulation and adaptations. Inflammation and repair. In: *Robins' pathologic basis of disease.*

5th edn. Ed. F.J. Schoen. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 35-92.

Jacobs, K.A., Leach, D.H., Fretz, P.B. and Townsend, H.G.G. (1984) Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet. Surg.*

**1**

**3**

, 83-90.

Knottenbelt, D.C. (1997) Equine wound management: are there significant differences in healing at different sites on the body? *Vet. Derm.* **8**, 273-290.

Moulin, V. (1995) Growth factors in skin wound healing. *Eur. J. Cell. Biol.* **68**, 1-7.

Shah, M., Foreman, D.N.M. and Ferguson, M.W.J. (1994) Neutralising antibody to TGF- $\beta$ 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J. Cell. Sci.* **107**, 1137-1157.



Shah, M., Foreman, D.N.M. and Ferguson, M.W.J. (1995) Neutralisation of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 or exogenous addition of TGF- $\beta$ 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J. Cell. Sci.* **108**, 985-1002.

Stashak, T.S. (1991) *Equine wound management*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp 1-18.

Van den Boom, R., Wilmink, J.M., Wood, J. and Ferguson, M.W.J. (2002) Transforming growth factor- $\beta$  levels during second-intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Repair Regen.* **10**, 188-194.

Wilmink, J.M., Stolk, P.W.T., van Weeren, P.R. and Barneveld, A. (1999a) Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopical aspects. *Equine vet. J.* **31**, 53-60.

Wilmink, J.M., van Weeren, P.R., Stolk, P.W.T., van Mil, F.N. and Barneveld, A. (1999b) Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine vet. J.* **31**, 61-67.

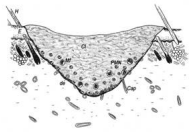
Wilmink, J.M., Nederbragt, H., van Weeren, P.R., Stolk, P.W.Th., Barneveld, A. (2001) Differences in wound contraction between horses and ponies: the *in vitro* contraction capacity of fibroblasts. *Equine vet. J.* **33**, 499-505.

Wilmink, J.M., van Herten, J., van Weeren, P.R. and Barneveld, A. (2002) Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine vet. J.* **34**,

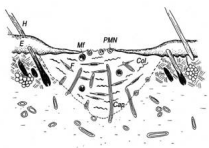
270-273.

Wilmink, J.M., Veenman, J.N., van den Boom, R, Rutten, V.P.M.G., Niewold, T.A., Broekhuisen-Davies, J.M., Lees, P., Armstrong, S., van Weeren, P.R. and Barneveld, A. (2003) Differences in wound healing efficiency between horses and ponies may be related to differences in function of polymorphonucleocytes and local inflammatory response. *Equine vet. J.*, in press.

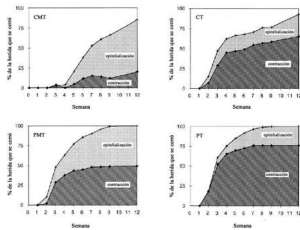
### Figuras



**Fig. 1** Representación esquemática de una herida en la fase inflamatoria. El defecto ha sido llenado por un coágulo que va ser reemplazado por tejido más definitivo. Cap: vaso sanguíneo; Mf: macrófago; PMN: leucocitos polimorfonucleares; E: epitelio; H: pelo; Cl: coágulo. (Modificado de: Wilmink, J.M. (2000) Wound healing in horses and ponies, the role of inflammation and contraction. Thesis, Utrecht).



**Fig. 2** Representación esquemática de una herida en la fase de contracción. A herida ha disminuido en tamaño. Los fibroblastos están bien ordenados perpendiculares a los vasos sanguíneos y paralelos a la superficie. Cap: vaso sanguíneo; Mf: macrófago; PMN: leucocitos polimorfonucleares; E: epitelio; H: pelo; Col: colágeno. (Modificado de: Wilmink, J.M. (2000) Wound healing in horses and ponies, the role of inflammation and contraction. Thesis, Utrecht).



**Fig. 3** Diferencias en la forma de cerrar de heridas en los miembros y en el trunco de caballos y ponis. CMT: metatarso del caballo; CT: trunco del caballo; PMT: metatarso del poni; PT: trunco del poni. Es evidente que el papel de la contracción es más grande en el poni (y menos en el metatarso del caballo). (Modificado de: Wilmink, J.M. (2000) Wound healing in horses and ponies, the role of inflammation and contraction. Thesis, Utrecht).