

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

TEMA: *“Plasma Rico en Plaquetas Activado mediante el Ozono como Tratamiento en Ligamentos Colaterales de la Articulacion Falangiana Distal ”*

TITULO: *PLASMA RICO EN PLAQUETAS OZONIZADO EN LESIONES DE LOS
LIGAMENTOS COLATERALES DE LA ARTICULACIÓN INTERFALANGIANA
DISTAL*

Alumno: M.V. Alonso Roberto.

Tutor: M.V. Esp. García Liñeiro, José Alberto.

Año: 2013.

ÍNDICE

• Introducción	2
• Objetivos.....	3
• Revisión bibliográfica.....	3
Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	4
Factores de Crecimiento.....	8
Ozono.....	10
Asociación de PRP y Ozono.....	11
Obtención De Plasma Rico en Plaquetas.....	12
Investigación Básica que Sustenta el Uso Clínico de Concentrados Autólogos de Plaquetas en Equinos.....	13
• Materiales y Métodos.....	15
• Resultados.....	20
• Discusión.....	21
• Conclusión.....	22
• Bibliografía.....	23

PLASMA RICO EN PLAQUETAS OZONIZADO EN LESIONES DE LOS LIGAMENTOS COLATERALES DE LA ARTICULACIÓN INTERFALANGIANA DISTAL

INTRODUCCIÓN

Estudios realizados por el Dr. Bocci(1999) y Re(2010), han demostrado que la ozonización del plasma heparinizado promueve la agregación plaquetaria acentuando así la liberación de sus factores de crecimiento, observándose una gran diferencia entre la sangre anticoagulada con citrato o con heparina manifestándose aumento de la agregación plaquetaria en un 20% con una concentración de ozono de 40 $\mu\text{g/mL}$ y en un 68% cuando la concentración es de 80 $\mu\text{g/mL}$. Los factores de crecimiento derivados de las plaquetas, como PDGF AB, se liberan especialmente cuando la sangre está heparinizada, a partir de 40 $\mu\text{g/mL}$ de ozono, superando en más del doble a lo que se libera si la sangre se trata con citrato. Al ozonizar el PRP se forman ozónidos y otros derivados, que difunden en el interior de la plaqueta, activando la fosfolipasa C y la A2 facilitando la formación de sustancias pro-agregantes (PGE2, Tromboxano, etc.). Con ello se consigue no solo liberar los factores de crecimiento más rápidamente, sino que la formación de peróxidos desplegando muchas rutas metabólicas curativas que estaban silentes. Los ligamentos colaterales de la IFD han sido tratados con shock wave, tecaterapia, no existiendo referencias del uso del PRP ozonizado sobre estas lesiones.

OBJETIVOS

- Describir los efectos de la inyección de plasma rico en plaquetas ozonizado en equinos afectados por lesiones ligamentosas de la articulación interfalangeana distal.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

Los concentrados de PRP han sido ampliamente utilizados en la última década como complemento en las técnicas de regeneración de los tejidos. Los autores que han empleado clínicamente el PRP aseguran que no hay riesgo de infección o transmisión de enfermedades y niegan la existencia de algún tipo de efecto indeseable (Martinez y col 2002).

Plasma rico en plaquetas (PRP) es una preparación de sangre total que contiene varios factores de crecimiento importante en la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, además de la síntesis y deposición de matriz extracelular. Hay varios estudios en la literatura acerca de la acción del PRP en la reparación de lesiones músculo-esqueléticas y de la piel en varias especies, con resultados prometedores (Vendruscolo 2012).

Las plaquetas son pequeños fragmentos citoplásmicos anucleadas, discoides derivadas de megacariocitos de la médula ósea. Tienen 5-7 mm de diametro y 3 mm ancho (Feldman 2000). Estos fragmentos contienen varias proteínas citoplásmicas, las citocinas y factores bioactivos que están implicadas en la regulación de los aspectos básicos de la reparación de tejidos y la coagulación de la sangre (Marx 2011).

El PRP es un concentrado de plaquetas y factores de crecimiento que incluye: el factor transformante beta (TGF-b), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) entre otros (Schwartz y col 2011).

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se define como la porción de la fracción de plasma de sangre autóloga que tiene una concentración de plaquetas superior al valor basal (Marx 2011). El PRP no solo contiene plaquetas, sino que además está formado por: plasma, eritrocitos, leucocitos, células mesenquimales circulantes factores de crecimiento, proteínas séricas como el fibrogénico, fibrina, vitronectina y trombospondina, que intervienen en el proceso de curación y todos los componentes de la cascada de coagulación (Schwartz y col 2011, Abellaner 2009). Sin embargo, el componente que motiva mas el interés son los factores de crecimiento plaquetarios

contenidos en los gránulos α y que se liberan durante el proceso de activación plaquetaria (Abellaner 2009).

Se ha constatado que posee efectos antiinflamatorios y que tiene efectos beneficiosos en la aceleración de los procesos de cicatrización cutánea y de tejidos blandos (Maestro y col 2007).

El PRP está emergiendo como método un económico para obtener y administrar factores de crecimiento autologos. Y sus características fundamentales como vehículo terapéutico son:

- Es rico en factores de crecimiento y contiene proteínas biológicamente activas.
- Posibilita la acción conjunta de varios factores de crecimiento al mismo tiempo.
- Incrementa la vascularización de los tejidos a través de la estimulación de la angiogénesis.
- Proporciona un inmediato agente hemostático biocompatible, efectivo y seguro, que es absorbido por el cuerpo iniciando una regeneración local.
- Estimula la quimiotaxis, diferenciación y multiplicación de múltiples linajes celulares, la síntesis de la matriz extra celular y ácido hialurónico.
- Acelera la regeneración de tejidos blandos, e inicia la cascada de osteogénesis y la reparación de tejidos estimulando la epitelización. (Dong y col, Martinez y col 2002).
- La mejoría visible de la cicatrización de los tejidos blandos y una mayor cohesividad en los injertos particulados, que facilita su manipulación.
- Es atóxico e inmunorreactivo (Becay col 2007).

El PRP se obtiene de sangre no coagulada, debido a que las plaquetas son parte del coágulo y no han sido activadas y degranuladas (Foster y col 2009). Se puede obtener básicamente por tres técnicas: Tubo (manual), Centrifugado (semiautomático) y Aféresis (automático) (Prades y col 2006). En estos procedimientos varían el costo, la facilidad de preparación, el volumen de sangre requerido y la concentración de plaquetas obtenidas. En primero los costos son mínimos, la cantidad utilizada es pequeña y el PRP se obtiene fácilmente, pero con baja concentración de plaquetas. Los costos de centrifugación son bajos, pero es necesario para adquirir una centrífuga, el volumen requerido es pequeño y también es fácil de obtener y se obtiene una mayor concentración de plaquetas. El último método es caro, porque se requiere un equipo y

"kits", el volumen específico de sangre requerido es grande, pero de igual forma se obtiene altas concentraciones de plaquetas y obtiene un mayor volumen de PRP. También hay un método desarrollado por VetCell (Quy Bioscience Ltd., T / VetCell A, Inglaterra) en la que se recoge la sangre en una bolsa y que pasa a través del dispositivo de Pall para capturar las plaquetas. Después de lavar los filtros de las plaquetas, que se recuperan en solución, siendo fácil de realizar, pero con un alto costo. Las concentraciones obtenidas en diferentes estudios se muestran en la siguiente tabla (Vendruscolo 2012).

Autor	Método de preparación	Concentración media de plaquetas
Maia et al. ²²	Centrifugado	407.500 plaquetas/ μ l
Bosch et al. ²³	GPS II, Biomet*	639.700 plaquetas/ μ l
Carmona et al. ²⁴	Centrifugado	250.000 plaquetas/ μ l
Textor et al. ²⁵	Centrifugado	1.765.000 plaquetas/ μ l
Textor et al. ²⁵	Harvest Smart PReP2*	951.000 plaquetas/ μ l

*Kits comerciales para la preparación de PRP.

Está indicado en aquellas situaciones en que se precise estimular la regeneración celular. Sobre todo cuando existe degeneración de partes blandas: tendinitis degenerativas, degeneración discal, fascitis, degeneración del cartílago. Se está utilizando con éxito actualmente en: Condropatías, osteocondritis y artrosis, Lesiones de ligamentos de la rodilla u otras articulaciones, Ligamentoplastias, Lesiones musculares y tendinosas, Consolidación ósea, Implantación de prótesis articular, Cicatrización de úlceras y heridas, Lesiones corneales, Implantes dentales, Regeneración cutánea: úlceras de decúbito, retardos de cicatrización, medicina estética entre otros (Schwartz y col 2011).

Estudios experimentales *in vitro* demostraron que el plasma rico en plaquetas incrementa la migración y la proliferación de queratinocitos y fibroblastos conjuntivales, además de que inhibe los procesos fibróticos al inhibir la diferenciación

de los miofibroblastos conjuntivales. Los reportes iniciales sobre los efectos de plasma rico en plaquetas son promisorios y abren un amplio campo de investigación que incluye el tratamiento de la queratoconjuntivitis sicca del síndrome de Sjögren, para la que hoy en día no existe un tratamiento satisfactorio, así como para la úlceras corneales de diversa etiología (Carrillo-Mora y col 2013).

Factores de Crecimiento

Son polipeptidos, contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular, que juegan un papel fundamental en la estimulación y la regularización de la curación de heridas en diferentes tejidos del organismo (Martinez y col 2002).

Estos factores de crecimiento estimularán receptores de la membrana celular de las células de los tejidos dañados sin entrar en ellas, provocando reacciones químicas en los neurotransmisores encargados de regular los procesos de reproducción y crecimiento celular favoreciendo la proliferación, migración y diferenciación celular y de esta manera quedará reproducida –lo más fielmente posible- el proceso fisiológico de reparación tisular pero este será absolutamente circunscripto a la zona lesional por nuestra infiltración en una dosis –por mayor concentración-más importante que la fisiológica a la que agregamos el beneficio de la posibilidad de otra o más aplicaciones en consulta externa, si fuera necesario en casos excepcionales (Kirchner 2012).

De todos los factores de crecimiento liberados por las plaquetas, los que se encuentran en mayor concentración y cuya estructura y función ha sido ampliamente estudiada son el PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) y el TGF-beta (Transforming-Derived Growth Factor). Son directamente responsables de la regulación de procesos celulares tales como la diferenciación, mitogenesis y la quimiotaxis, funciones biológicas clave en los mecanismos de la reparación de tejidos (Maestro y col 2007).

Los factores de crecimiento ejercen la función de regeneración del lecho donante y que, en líneas generales, son el factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), El factor de crecimiento de transformación-beta (TGF-beta), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento epidérmico (Beca y col 2007).

- PDGF: promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos, por un mecanismo de quimiotaxis. Es activador de macrófagos, mitogeno de las células endoteliales y facilita la formación de colágeno tipo I. El 50% del efecto mitogenico proveniente de las plaquetas. Producido por las plaquetas principalmente, macrófagos, osteoblastos en su isoforma BB, condrocitos, fibroblastos y células endoteliales (Martinez y col 2002, Schwartz y col 2011, Beca y col 2007, Ross y col 1986).
- TGF-beta: se encuentra involucrado en la quimiotaxis, en la proliferación y diferenciación de las células mesenquimales, ayuda en la síntesis del colágeno por los osteoblastos, es pro-angiogénesis, inhibe la formación de osteoclastos y la proliferación de las células epiteliales en presencia de otros factores. Tiene efecto mitogenico en las células mesenquimales e inhibe la proliferación en las células epiteliales dependiendo de la presencia de otros factores de crecimiento. Entre las células que lo producen están las plaquetas, macrófagos, linfocitos, neutrofilos, células mesenquimales, osteoblastos y matriz osea (Martinez y col 2002, Schwartz y col 2011, Beca y col 2007, Kloen y col 1997).
- FGF: coopera en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, también en la proliferación de fibroblastos e inducción de la secreción de fibronectina por estos, pro-angiogénesis por acción quimiotáctica sobre células endoteliales e inhiben los osteoclastos. Producido principalmente por los fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, plaquetas y células endoteliales (Martinez y col 2002, Schwartz y col 2011, Beca y col 2007).
- IGF: ayuda en la síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno I por los osteoblastos, igualmente en la proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de revestimiento. Proviene de las plaquetas, macrófagos, osteoblastos, células mesenquimales y la matriz osea (Martinez y col 2002, Schwartz y col 2011, Beca y col 2007).
- VEGF: involucrado en la quimiotaxis y proliferación de células endoteliales y la hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos. Entre las células que lo producen están la

plaquetas, los macrófagos, los osteoblastos y las células musculares lisas, sobre todo en caso de hipoxia (Martínez y col 2002, Schwartz y col 2011, Beca y col 2007).

- EGF: es mitogénico, proapoptótico, quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos a partir de las células mesenquimales. Es producido por las plaquetas en su mayoría, los fibroblastos y las células endoteliales (Martínez y col 2002, Schwartz y col 2011, Beca y col 2007).

El mecanismo fundamental de liberación de factores de crecimiento por los concentrados plaquetarios es de difusión, y se basa en los gradientes de concentración de los distintos factores en un momento específico de la cicatrización (Beca y col 2007).

Ozono

Las investigaciones realizadas en el siglo XIX sobre las propiedades del ozono mostraron que es capaz de reaccionar con la mayoría de sustancias orgánicas e inorgánicas hasta su oxidación completa, es decir, hasta la formación de agua, óxidos de carbono y óxidos superiores. En relación con su reactividad frente a las sustancias biológicas se estableció la influencia selectiva del ozono sobre las sustancias que poseen enlaces dobles y triples. Entre éstas se relacionan las proteínas, los aminoácidos y los ácidos grasos insaturados, que forman parte de la composición de los complejos lipoproteicos del plasma y de las capas dobles de las membranas celulares (Schwartz y col 2012).

En cantidades adecuadas y controladas, estos derivados de la reacción del O₃ con los dobles enlaces celulares, ejercen diferentes funciones biológicas y terapéuticas, actuando como segundos mensajeros, activan enzimas, como mediadores químicos y de respuesta inmune, regula el metabolismo del oxígeno, regula el estrés oxidativo, interviene en la liberación de autacoides, modulador inmunológico, germicida de amplio espectro, regulador metabólico entre otros (Schwartz y col 2012).

La ozonoterapia local y sistémica se ha estado aplicando empíricamente en humanos desde hace más de 40 años y una variedad de enfermedades, no relacionadas entre sí, han sido tratadas con buenos resultados. Esto es porque el ozono posee una

serie de propiedades que lo hacen muy útil en el campo de la medicina, como son el mejoramiento de las propiedades reológicas de la sangre y su circulación a través de los vasos capilares, incremento de la capacidad de absorción de oxígeno en los eritrocitos así como transferencia hacia los tejidos, activación de los sistemas de defensa antioxidante y esto produce una modulación del estrés oxidativo, efecto modulador de la respuesta biológica entre otras (Rilling 1983).

Durante largo tiempo en el pasado la aplicación del ozono en la práctica médica no era muy aceptada por las ideas infundadas sobre su toxicidad en relación con las altas concentraciones empleadas en la industria. Como todo medio de curación, la ozonoterapia es dependiente de la dosis. Es importante conocer que en la práctica clínica las concentraciones de ozono son inferiores a las tóxicas en varios órdenes de magnitud. En el diapasón de estas concentraciones el ozono actúa como medio terapéutico y muestra propiedades inmuno-moduladoras, anti-inflamatorias, bactericidas, antivirales, fungicidas, analgésicas y otras (shcwartz y col 2012).

El ozono promueve la agregación plaquetaria y la liberación de factores de crecimiento provenientes de las plaquetas. La activación de plaquetas con ozono puede ser útil en el tratamiento de úlceras crónicas y de tejidos blandos, la cirugía oral y periodontal, cirugía maxilofacial, cirugía ortopédica y traumatología, cirugía plástica y cosmética, cirugía de columna, cirugía cardiovascular y quemaduras (shcwartz y col 2012).

Asociación de PRP y Ozono

Cuando el ozono entra en contacto con los fluidos biológicos (sangre, plasma, linfa, suero salino fisiológico, orina, etc.) se disuelve en el agua presente en estos fluidos y reacciona en segundos. Los antioxidantes hidrófilos y lipófilos presentes en esos líquidos orgánicos, agotan una cantidad considerable de la dosis del ozono, pero si la concentración aplicada es la correcta, permite la formación de cantidades apropiadas de especies reactivas del oxígeno, ERO y POL (producto de la lipoperoxidación). La formación de ERO en el plasma es extremadamente rápida (menos de un min) y se acompaña de una disminución transitoria y pequeña, dependiente del ozono, de la capacidad antioxidante (que va del 5 % al 25%). Esta capacidad antioxidante recupera su normalidad a los 15 min -20 min. Pero ya el peróxido de hidrógeno y otros

mediadores la han difundido al interior de las células activando distintas rutas metabólicas en eritrocitos, leucocitos y plaquetas, dando lugar a numerosos efectos biológicos. El peróxido de hidrógeno actúa entonces como una molécula señalizadora en el medio intracelular, un mensajero que el ozono a dosis terapéuticas ha disparado (Schwartz y col 2012).

El proceso de reparación tisular se lleva a cabo en distintas fases:

Fase inflamatoria: protege los tejidos de la invasión de sustancias nocivas, con aporte de cel. endoteliales, neutrófilos y monocitos.

Fase proliferativa (fibroplasia): comienza con la formación de tejido de granulación necesario para la migración celular y deposición de colágeno, tipo de células implicadas en esta fase son: macrófagos, fibroblastos y queratinocitos.

Fase de angiogénesis: este proceso se superpone con la fase proliferativa, en esta etapa juega un rol fundamental el aporte de ozono ya que aumenta la velocidad de aporte de nutrientes hacia el tejido de granulación. Esta fase comienza con la ruptura de la membrana basal por acción de la collagenasa y plasminógeno (activador secretado por las células endoteliales), intervienen en esta fase cel. endoteliales y pericitos.

Fase de depósito y remodelación : etapa que se caracteriza por la disminución del número de fibroblastos y por alcanzar el equilibrio entre la producción de colágeno y su lisis, este equilibrio entre síntesis de colágeno y su degradación durante la fase de remodelación dependerá de la presencia simultánea de metaloproteínas de matriz (MMPs) y sus inhibidores específicos (TIMPs)

Obtención De Plasma Rico en Plaquetas.

Whitman y col (1997) introdujeron el uso de PRP como sustituto del pegamento de fibrina autóloga (Matras 1982), después de esto, muchos dispositivos automatizados, semiautomatizados y métodos manuales se han desarrollado para la concentración de plaquetas (Zimmermann y col 2001, 2003, Appel y col 2002, Weibrich y col 2002 y 2003, Eppley y col 2004). Estos dispositivos concentran más PTLs, leucocitos y GFs que algunos procedimientos de aféresis (Marx y col 1998) y el método del tubo

(Weibrich y col 2005, Tamimi y col 2007). Todas las técnicas utilizadas para preparar PRP presentan ventajas e inconvenientes. Aún no se ha desarrollado un método o dispositivo ideal para concentrar plaquetas y factores de crecimiento.

El sistema de aféresis requiere alta tecnología, personal experimentado y gran volumen de sangre (Marx y col 1998, Weibrich y col 2002) sin embargo, se presenta un bajo riesgo de contaminación bacteriana durante la preparación de los PRP (Vasconcelos y col 2003). Los sistemas semiautomatizados (buffy coat) permiten concentrar un elevado número de PLTs y GFs en comparación con otras técnicas (Zimmermann y col 2003, Eppley y col 2004) y además el riesgo de contaminación bacteriana es menor (Vasconcelos y col 2003) que con el método manual (tubo) (Weibrich y col 2005).

Sin embargo, estos dispositivos también concentran un elevado número de leucocitos y son costosos. Es importante señalar que la función exacta de los leucocitos en los PRP no se ha establecido. Sin embargo, se cree que la concentración de un gran número de glóbulos blancos en los PRP podría ser perjudicial para los tejidos tratados (Zimmermann y col 2003). Los métodos manuales (tubo) son sencillos y económicos; sin embargo requieren de un estricto manejo aséptico para evitar la contaminación bacteriana (Weibrich y col 2005, Tamimi y col 2007, Álvarez y col 2010). Las ventajas del método del tubo incluyen su simplicidad y bajo costo, mientras que los métodos semiautomatizados son costo-limitantes, ya que requieren kits y centrífugas especializadas. Los métodos mencionados, para la obtención de PRP usados originalmente en humanos han sido validados para su aplicación en equinos. Se ha evaluado la capacidad para concentrar PLTs, leucocitos, algunos GFs (Carter y col 2003, Sutter y col 2004, Arguélles y col 2006, Schnabel y col 2007, Carmona y col 2008).

Investigación Básica que Sustenta el Uso Clínico de Concentrados Autólogos de Plaquetas en Equinos

Las plaquetas contienen GFs que han sido evaluados individualmente en cartílago y tendón equino. De estos, el PDGF-BB e IGF-I han demostrado efectos positivos en tendón in vitro (Haupt y col 2006) e in vivo (Dahlgren y col 2002). Lo mismo ha sido documentado en condrocitos equinos in vitro, especialmente con IGF-I

(Frisbie y col 2000) y TGF-B1 (Fortier y col 1997). Estos GFs incrementan la síntesis de ECM del cartílago articular y producen proliferación de condrocitos. La investigación del efecto de los PRP en equinos se ha centrado en estudios en sistemas in vitro (Smith y col 2006, Schnabel y col 2007, 2008, McCarrel y Fortier 2009) y en modelos de tendinitis (Maia y col 2009, Bosch y col 2010).

Se puede apreciar que ambos métodos para concentrar plaquetas produjeron resultados biológicos similares en estos estudios experimentales PRP sobre el metabolismo de tenocitos y/o miofibroblastos y la matriz celular de tendón y/o ligamentos en equinos. Los PRP aumentan la capacidad metabólica y proliferativa de tenocitos y fibroblastos, la cual se hace evidente al aumentar la expresión de colágeno tipo I y la matriz de proteína oligomérica de matriz del cartílago (COMP) (Smith y col 2006, Schnabel y col 2007, 2008). Por otra parte, (Anitua y col 2005) demostraron in vitro que estas sustancias promovían la angiogénesis mediante el incremento de la expresión del factor de crecimiento vasculo-endotelial(VEGF). Recientemente, se ha publicado una investigación sobre el efecto de los APC (obtenido en tubo) en un modelo equino de tendinitis inducida por collagenasa (Maia y col 20011) y otra sobre el efecto de un PRP (método semiautomatizado) sobre la calidad de la reparación de lesiones tendinosas centrales (core lesión) inducidas mecánicamente. En el primer estudio se observó que a los 36 días los caballos tratados con PRP tenían una mejor disposición histológica de las fibras de colágeno y fibroblastos sobre la matriz de sus tendones en comparación con los caballos del grupo control. Sin embargo el número de fibroblastos y vasos sanguíneos no fue diferente entre ambos grupos (Maia y col 2009). En el segundo estudio se observó que a los 6 meses el grupo de caballos tratados con APC presentó una mejor arquitectura histológica, mayor contenido de colágeno, glicosaminoglicanos, DNA y mayor resistencia tensil que el grupo control (Bosch y col 2010). Se puede apreciar que ambos métodos para concentrar plaquetas produjeron resultados biológicos similares en estos estudios experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios para la selección de pacientes

Desde abril de 2011 a marzo de 2013, se seleccionaron 8 caballos de salto afectados por desmitis de ligamentos colaterales de articulación interfalangiana distal, con diagnóstico protocolizado por según los siguientes criterios:

- claudicación positiva de 3/5.
- anestesia interfalangiana distal positiva a los 5 minutos.
- ultrasonografía: desmitis de ligamentos colaterales de la articulación interfalángica distal más efusión sinovial (clasificación en grado 1 a 4).

Figura 1.

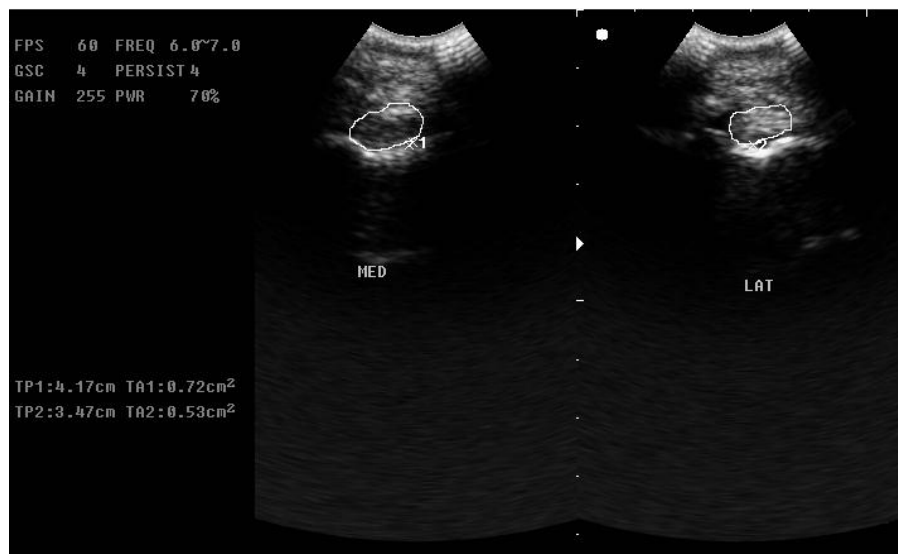


Figura 1. La diferencia de la lesiones de cada ligamento. MED: mayor lesión estructural del ligamento colateral. LAT: menor lesión estructural del ligamento colateral.

De los 8 equinos seleccionados, 5 (Cinco) fueron tratados con PRP ozonizado inyectado ecoguiado en el ligamento y 3 (tres) equinos fueron inyectados con PRP convencional. Como tratamiento de base todos tuvieron:

- Herrajes ortopédicos que modificaron la superficie de apoyo (herraduras con rama ancha del lado afectado) y 30 días de reposo.
- Aplicación de ácido hialurónico intraarticular. Todos los caballos fueron estabulados a box, teniendo caminatas de salud 20 minutos a la mañana

y a la tarde. Su evolución fue controlada a 30 días de la aplicación del P.R.P. Como protocolo de evolución se consideró:

- a) evolución de la claudicación.
- b) respuesta a la flexión forzada.
- c) evaluación ultrasonográfica.

El protocolo para la elaboración del PRP Ozonizado fue de la siguiente manera:

Se procede a la tricotomía y antisepsia de una zona de la vena yugular y se realiza una extracción de sangre con una jeringa de 40cm cargada con 4cm de heparina, (Figura 2), la muestra es homogenizada y pasada a un tubo para la primera centrifugación (2000 rpm x 10min) (Figura 3 y 4).

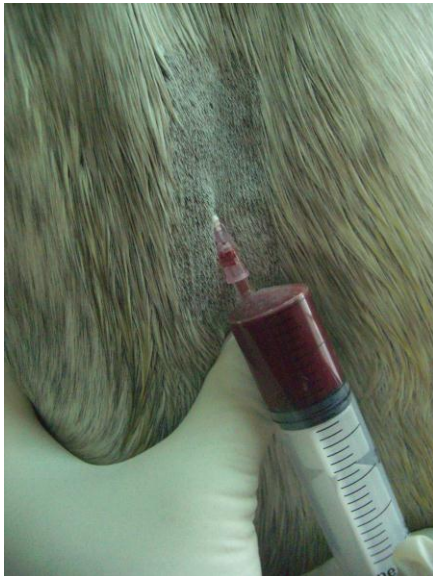


Fig. 2: Toma de muestra.



Fig. 3: Tubo con sangre para primera centrifugación.



Fig. 4: Primera centrifugación.

Obteniéndose un plasma sobrenadante que tiene dos porciones, una superior de plasma pobre en plaquetas (PPP) y otra inferior de plasma rico en plaquetas (PRP) y en el fondo del tubo se encuentran los elementos blancos y rojos, (Figura 5). De este tubo tomamos con una pipeta la porción del PRP la depositamos en otro tubo para una segunda centrifugación (Figura 6), y el PPP es descartado junto con los glóbulos blancos y rojos. A partir de la segunda centrifugación (Figura 7), extraemos con una pipeta el PRP propiamente dicho.

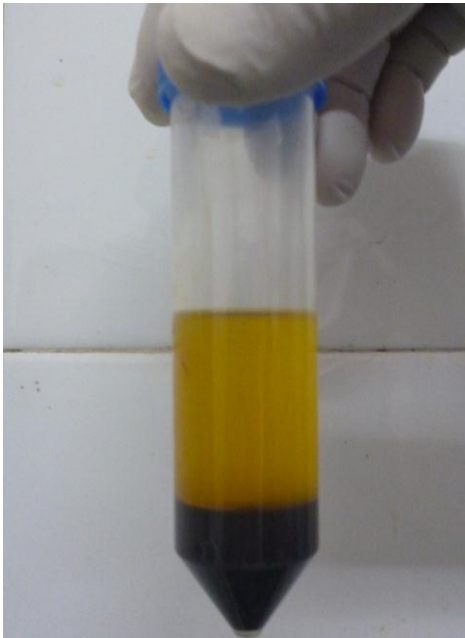


Fig. 5: Primera centrifugacion.



Fig. 6: Extracion del PRP para 2da centrifugacion.



Fig. 7: Segunda centrifuga.

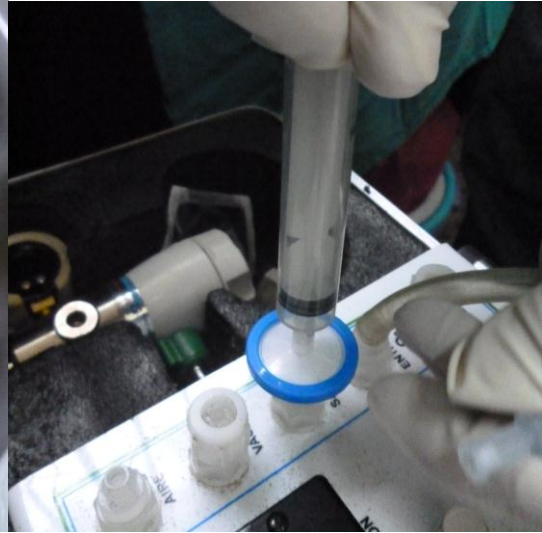


Fig. 8: Carga de ozono.

Por otro lado cargamos la jeringa con ozono (Figura 8), y de aquí en más se procede a mezclar el PRP con el ozono por medio de una aguja larga (Figura 9). Luego se carga el PRP ozonizado en una jeringa y se procede a la inyección. Cabe resaltar que todo el procedimiento se hizo en un ambiente estéril con paños de campo quirúrgico, materiales nuevos y esterilizados (Figura 10).



Fig. 9: Mezcla del ozono y prp.



Fig. 10: Materiales esteriles.

RESULTADOS

Al día 30, es notable la mejoría observada en el grupo tratado con PRP ozonizado, ya que el 80% no manifiesta claudicación y el 20% restante presenta grado 1-5. En el grupo control, tratado con PRP convencional, el 67% manifiesta claudicación en grado 2-5, y el 33% restante, grado 1-5. Respecto a la maniobra de Flexión forzada en el grupo tratado con PRP ozonizado, es notable la mejoría, ya que el 80% resulta negativa la respuesta, y solamente 1 equino es positivo (20%). En el grupo control, por el contrario, no se observan cambios, todos resultan positivos a esta maniobra.

En la evaluación ultrasonográfica, se observa una mejoría considerable en el grupo tratado con PRP ozonizado, ya que el 60% tiene grado 1, en los cuales hay signos evidentes de curación, y el 40% ya no manifiesta lesión (grado 0). El 100% del grupo control presenta grado 2.

DISCUSION

Como puede observarse, el 80 % de los pacientes tratados con PRP ozonizado remitió los síntomas evaluados en el protocolo aplicado; por otro lado el grupo control (tratados con PRP sin ozonizar) no presentó porcentaje de remisión completa en ninguno de los parámetros evaluados.

Este resultado concuerda con los estudios realizados por el Dr. Bocci (1999) y Re (2010), que han demostrado que la ozonización del plasma heparinizado promueve la agregación plaquetaria acentuando así la liberación de sus factores de crecimiento.

Estos resultados demuestran la consistencia del efecto del ozono sobre la agregación plaquetaria, que puede ser uno de los mecanismos de sus acciones terapéuticas conocidas. Esto sugiere la utilidad de realizar otros estudios, que permitan profundizar en el conocimiento de la influencia del tratamiento con ozono, sobre los componentes del mecanismo hemostático y su asociación con la efectividad de esta terapéutica en el tratamiento de las patologías de origen tendoligamentosas en equinos.

CONCLUSIÓN

la aplicación de PRP ozonizado intra-ligamentoso parece ser favorable, ya que en el grupo problema no sólo mejoran las manifestaciones clínicas externas (presencia de claudicación y/o la respuesta a la maniobra de flexión forzada), sino que también se observa mejoría ultrasonográfica, observándose lesión curada (grado 0) o con signos evidentes de curación (grado 1). En el grupo control, al que se le aplicó PRP convencional también se observa una tendencia a la mejoría, pero más lenta en comparación con la demostrada por los equinos a los que se les aplicó PRP ozonizado.

BIBLIOGRAFIA

1. Dong X., Shi W., Zeng Q., Xie L. 2005. Roles of adherence and matrix metalloproteinases in growth patterns of fungal pathogens in cornea. *Curr Eye Res* 3:613-620.
2. Martínez JM, Cano J, Gonzalo JC, Campo J, Esparza GC, Seoane JM. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de plasma rico en plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Medicina Oral* 2002; 7: 375-90.
3. Schwartz, A. Martínez- Sánchez, G. Re, L. (2011). Factores de crecimiento derivados de plaquetas y sus aplicaciones en medicina regenerativa. Potencialidades del uso del ozono como activador. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol.1, nº 1, pp. 54-73.
4. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001; 10(4): 225-8.
5. Abellaner de Oleza I. (2009). Terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencias clínicas y bioquímicas que validan su utilización. Phd Tesis. Universidad Autònoma de Barcelona, Departament de Medicina i Cirurgia Animals. Facultat de Veterinària.
6. Maestro Fernandez A., Martinez Renobales J., Sanchez Zapirain I., et al. Cirugía abierta más plasma rico en factores de crecimiento (PDGF) en roturas agudas del tendón de Aquiles. *Patología Del Aparato Locomotor*, 2007. Vol.5. Supl I: 79-82.
7. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol*. 2007; 19, 1: 39-52.
8. Kirchner, F. (2012). Tratamiento de las patologías discales y degenerativas de la columna vertebral con Plasma Rico en Factores de

Crecimiento Plaquetario Ozonizados. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol. 2, nº 1, pp. 91-106.

9. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet derived growth factor. *Cell* 1986; 46: 155-69.
10. Kloen P, Gebhardt MC, Perez-Atayde A, Rosenberg AE, Springfield DS, Gold LI, et al. Expression of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms in osteosarcomas. TGF- β 3 is related to disease progression. *Cancer* 1997; 80: 2230-9.
11. Schwartz, A; Martínez-Sánchez, G. (2012). La Ozonoterapia y su fundamentación científica. *Revista Espanola de Ozonoterapia*. Vol. 2, nº 1, pp. 163-198.
12. Rilling SH. The possibilities of medical onoze application in light of the historical development of ozone therapy. *Ozo Nachrichten*. 1983; 2: 26.
13. Vendruscolo CP. et al. Plasma rico em plaquetas: Uma nova perspectiva terapêutica para medicina equina. *Vet. e Zootec*. 2012 março; 19(1): 033-043.
14. Feldman BF. Schalm's veterinary hematology. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
15. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009;37:2259-72.
16. Prades M, Abellanet I, Carmona JU, Argüelles D, Masri M. Platelet rich plasma: a realistic alternative in tissue repair. In: Proceedings of the 15th Annual Meeting European College of Veterinary Surgeons; 2006, Seville. Seville: ECVS; 2006. p.211-6.
17. Carrillo-Mora P, Adriana González-Villalva, Salvador Israel Macías-Hernández, Carlos Pineda-Villaseñor. Plasma Rico En Plaquetas.

Herramienta Versátil De La Medicina Regenerativa?. *Cir Cir* 2013;81:74-82.

18. Whitman DH, RL Berry, DM Green. 1997. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 55, 1294-1299.
19. Matras H. 1982. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 40, 617.
20. Zimmermann R, R Jakubietz, M Jakubietz, E Strasser, A Schlegel, J Wiltfang, R Eckstein. 2001. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 41, 1217-1224.
21. Zimmermann R, D Arnold, E Strasser, J Ringwald, A Schlegel, J Wiltfang, R Eckstein. 2003. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang* 85, 283-289.
22. Appel TR, B Pötzsch, J von Müller, JJ Lindern, SJ Bergé, RH Reich. 2002. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Implant Res* 13, 357-362.
23. Weibrich G, WK Kleis, R Buch, WE Hitzler, G Hafner. 2003^a. The Harverst Smart PReP system versus the Friadent-Schütze platelet rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res* 14, 233-239.
24. Weibrich G, WK Kleis, G Hafner, WE Hitzler, W Wagner. 2003^b. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res* 14, 357-362.
25. Eppley BL, JE Woodell, J Higgins. 2004. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconst Surg* 114, 1502-1508.

26. Marx RE, ER Carlson, RM Eichstaedt, SR Schimmele, JE Strauss, KR Georgeff. 1998. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85, 638-646.
27. Weibrich G, WK Kleis, WE Hitzler, G Hafner. 2005. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-ingrowth-factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 29, 118-123.
28. Tamimi FM, S Montalvo, I Tresguerres, L Blanco-Jerez. 2007. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 1084-1093.
29. Weibrich G, RS Buch, WK Kleis, G Hafner, WE Hitzler, W Wagner. 2002^a. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth factors* 20, 93-97.
30. Álvarez ME, CE Giraldo, JU Carmona. 2010. Contaminación bacteriana en concentrados de plaquetas de caballos. *Arch Med Vet* 42, 49-56.
31. Carter CA, DG Jolly, CE Worden, DG Hendren, CJ Kane. 2003. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 74, 244-255.
32. Sutter WW, AJ Kaneps, AL Bertone. 2004. Comparison of hematologic values and transforming growth factor- β and isulin-like growth factor concentrations in platelets concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res* 65, 924-930.
33. Argüelles D, JU Carmona, J Pastor, A Iborra, L Viñals, P Martínez, E Bach, M Prades. 2006. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Scien* 81, 237-245.

34. Schnabel LV, HO Mohammed, BJ Miller, WG McDermott, MS Jacobson, KS Santangelo, LA Fortier. 2007. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 25, 230-240.
35. Carmona JU, D Argüelles, M Prades. 2008. Transforming growth factor beta-3 and nitric oxide levels in four autologous platelet concentrates and plasma derived from equine blood. *Arch Med Vet* 40, 155-160.
36. Haupt JL, BP Donnelly, AJ Nixon. 2006. Effects of platelet-derived growth factor-BB on the metabolic function and morphologic features of equine tendon in explant culture. *Am J Vet Res* 67, 1595-1600.
37. Dahlgren LA, MCH van der Meulen, JEA Bertram, GS Starrak, AJ Nixon. 2002. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis, *J Orthop Res* 20, 910-919.
38. Frisbie DD, EA Sandler, GW Trotter, CW McIlwraith. 2000. Metabolic and mitogenic activities of insulin-like growth factor-1 in interleukin-1-conditioned equine cartilage. *Am J Vet Res* 61, 436-441.
39. Fortier LA, AJ Nixon, HO Mohammed, G Lust. 1997. Altered biological activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and supplemented with transforming growth factor beta-1. *Am J Vet Res* 58, 66-70.
40. Smith JJ, MW Ross, RK Smith. 2006. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts *in vitro*. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19, 43-47.
41. Schnabel LV, HO Mohammed, MS Jacobson, LA Fortier. 2008. Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. *Equine Vet J* 40, 260-265.

42. McCarrel T, L Fortier. 2009. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression, *J Orthop Res* 27, 1033-1042.
43. Maia L, MV de Souza, JI Ribeiro, AC de Oliveira, GES Alves, L dos Anjos Benjamin, YFR Silva, BM Zandim, JCL Moreira. 2009. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J Equine Vet Sci* 29, 618-626.
44. Bosch G, HT van Schie, MW de Groot, JA Cadby, CH van de Lest, A Barneveld, PR van Weeren. 2010. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res* 28, 211-217.
45. Smith JJ, MW Ross, RK Smith. 2006. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts *in vitro*. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19, 43-47.
46. Anitua E, I Andia, M Sánchez, J Azofra, MM Zalduendo, M de la Fuente, P Nurden, AT Nurden. 2005. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 23, 281-286.
47. Akeda K, HS An, M Okuma, M Attawia, K Miyamoto, EJ Thonar, ME Lenz, RL Sah, K Masuda. 2006. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1272-1280.
48. Anitua E, M Sánchez, AT Nurden, MM Zalduendo, M de la Fuente, J Azofra, I Andia. 2007. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology (Oxford)* 46, 1769-1772.

