



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en

Veterinaria

Uso de antibióticos en heridas cicatrizadas por segunda intención en el caballo:  
problemas y alternativas

Use of antibiotics in second intention equine wound healing: problems and  
alternatives

Autor/es

Laia Ferrer Gordó

Director/es

Antonio Romero Lasheras  
Laura Barrachina Porcar

Facultad de Veterinaria

2019

---

## Índice

1.	RESUMEN/ABSTRACT .....	3
2.	INTRODUCCIÓN .....	3
3.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	5
4.	METODOLOGÍA.....	5
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	6
5.1	Fases de la cicatrización.....	6
5.1.1	Inflamación.....	7
5.1.2	Formación de tejido de granulación.....	8
5.1.3	Contracción.....	8
5.1.4	Epitelización.....	8
5.2	Clasificación de las heridas.....	9
5.2.1	Heridas cicatrizadas por cierre primario.....	9
5.2.2	Heridas cicatrizadas por cierre primario retardado.....	9
5.2.3	Heridas cicatrizadas por segunda intención .....	9
5.2.4	Heridas cicatrizadas por segunda intención retardada .....	10
5.3	Factores que impiden o retrasan la cicatrización .....	10
5.3.1	Factores intrínsecos.....	10
5.3.2	Factores extrínsecos .....	11
5.4	Efecto de los antibióticos en las heridas cicatrizadas por segunda intención .....	11
5.5	Resistencias antibióticas en bacterias habituales de la piel.....	15
5.6	Tratamientos antimicrobianos alternativos al uso de antibióticos en heridas cicatrizadas por segunda intención .....	20
5.6.1	Materiales y sustancias coadyuvantes del proceso de cicatrización .....	20
5.6.2	Sustancias alternativas al uso de antibióticos .....	21
6.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....	26
7.	VALORACIÓN PERSONAL .....	27
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	28

## **1. RESUMEN/ABSTRACT**

Las heridas representan un elevado porcentaje de los casos atendidos por el veterinario equino. Según las circunstancias que rodeen la lesión, en ocasiones la reparación del defecto solo puede realizarse mediante cicatrización por segunda intención. En estos casos, habitualmente se administran antibióticos para prevenir su posible infección. Sin embargo, se ha comprobado que su efecto en la cicatrización de heridas abiertas es nulo e incluso perjudicial en caso de no haber infección. No obstante, el principal problema de una mala racionalización del uso de antibióticos es la aparición de múltiples mecanismos de resistencia. Se han detectado resistencias frente a muchos de antibióticos comúnmente empleados en caballos desarrollados por la mayoría de bacterias responsables de las infecciones en heridas en esta especie. Por el elevado impacto de las resistencias bacterianas en la salud global de animales y personas, surge la necesidad de reducir el uso de antibióticos y limitarlo a las situaciones en las que realmente son necesarios y efectivos, así como de buscar terapias antimicrobianas alternativas. Actualmente, existen evidencias prometedoras sobre estos tratamientos alternativos que sugieren un posible reemplazo en el futuro del uso de antibióticos para tratar las heridas cicatrizadas por segunda intención, pero es necesario desarrollar más su investigación para aplicarlos a la clínica equina.

Wound management represent a high percentage of the work load of the equine practitioner. Depending on the circumstances surrounding the injury, the healing of the defect by second intention is sometimes the only option. In these cases, antibiotics are usually administered to prevent a possible infection. However, it has been proven that effect of antibiotics on open wounds healing is null, and even harmful, when infection is not actually present. However, the main problem of poor rationalisation in the use of antibiotics is the emergence of multiple resistance mechanisms. Resistances have been detected against many of the antibiotics commonly used in horses, developed by most of the bacteria responsible for infections in wounds in this species. Due to the high impact of bacterial resistance on the global health of animals and people, there is an urgent need to reduce the use of antibiotics by limiting it to situations in which they are truly necessary and effective, as well as to seek for alternative antimicrobial therapies. Currently, promising evidence on these alternative treatments is rising, suggesting a possible replacement in the future of the use of antibiotics to treat wounds healed by second intention, but further research is needed to translate them to the equine clinic.

## **2. INTRODUCCIÓN**

El concepto de antibiosis, entendido como el uso de una sustancia derivada de un organismo vivo para matar a otro, es antiquísimo. La arsfenamina, fue el primer principio activo del grupo

de las sulfonamidas que se descubrió en 1910 por Sahachiro Hata<sup>1</sup>. Este compuesto arsénico se convirtió en el antimicrobiano más usado hasta 1940<sup>2</sup>. A partir de 1928, Alexander Fleming comenzó su investigación con diversos microorganismos incluido el *Penicillium notatum*. El primer documento demostrando el valor antimicrobiano de la penicilina fue publicado en 1940<sup>3</sup>. Sin embargo, la antibioterapia tal y como se conoce actualmente empezó en los tiempos de la Segunda Guerra Mundial<sup>4</sup>. En veterinaria, se empezó a administrar penicilina y estreptomicina a los animales desde 1946<sup>5</sup>. Desde entonces, se han descubierto numerosos compuestos antimicrobianos nuevos, y se han desarrollado muchas sustancias antimicrobianas sintéticas y semi-sintéticas para controlar las infecciones fúngicas y bacterianas en personas y animales<sup>6</sup>. Es necesario definir en este punto la diferencia de los términos antibiótico y antimicrobiano. La palabra antibiótico se define como una sustancia de bajo peso molecular producida por un microorganismo que a bajas concentraciones mata o inhibe otros microorganismos. En cambio, el concepto de antimicrobiano tiene una definición más amplia que el antibiótico, e incluye cualquier sustancia de origen natural, semi-sintético o sintético que mata o inhibe a otros microorganismos pero que causa un pequeño o nulo daño al hospedador. Habitualmente se utilizan ambas palabras de forma sinónima<sup>7</sup>.

Aunque los antibióticos han supuesto una revolución médica, actualmente su uso excesivo e inapropiado tanto en medicina humana como animal ha dado paso a la aparición de bacterias resistentes<sup>6</sup>. Las bacterias evolucionan continuamente y pueden adaptarse rápidamente, por lo que son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia a prácticamente todos los antimicrobianos utilizados<sup>8</sup>. Por eso, el tratamiento de infecciones bacterianas es cada vez un reto mayor debido al rápido desarrollo de polifarmacorresistencias en microbios<sup>6</sup>. La creciente preocupación por este problema queda plasmada en la creación en 2011 del Plan de Acción sobre Resistencia a los Antibióticos por parte de la Comisión Europea<sup>9</sup>, así como en las conclusiones del Consejo de la Unión Europea sobre el impacto de la resistencia a los antibióticos y cómo se debe abordar conjuntamente desde la salud humana y veterinaria<sup>10</sup>.

Por tanto, discernir en qué situaciones los antibióticos son necesarios y en qué otras no lo son, es una primera decisión de crucial importancia por parte del veterinario. Una situación especialmente compleja en este sentido son las heridas.

Las heridas representan una gran parte de la carga de trabajo de un veterinario de équidos. En varias encuestas alrededor de diferentes países se observó que las heridas en la piel son la condición médica más común que afecta a estos animales<sup>11-13</sup>.

A diferencia de otras especies, el proceso de cicatrización en caballos suele retrasarse y complicarse por situaciones como la imposibilidad de inmovilizar ciertas regiones anatómicas o de cerrar por primera intención algunas heridas, la elevada contaminación, o bien el estado de granulación que presenta la herida<sup>14</sup>. En algunos casos, según el tiempo transcurrido hasta que el veterinario atiende la herida, la cicatrización por segunda intención es la única opción. Este tipo de cicatrización es lenta, y las complicaciones como la formación de tejido exuberante, las cicatrices hipertróficas y la infección de las mismas son habituales, especialmente en heridas que afectan a las extremidades<sup>14-16</sup>. En este tipo de lesiones, se suelen utilizar antibióticos de forma rutinaria como prevención a una posible infección, cuando no siempre es necesario. Diversos estudios reflejan que casi la totalidad de cirujanos equinos encuestados habían administrado antibióticos sistémicos en casos con heridas contaminadas en las extremidades<sup>12,17</sup>.

La alta frecuencia de presentación de heridas en clínica equina, junto a la problemática de las resistencias microbianas a antibióticos y ligada a que los équidos son una especie susceptible de ir a consumo humano, hace que las heridas en estos animales sean un área especialmente interesante para buscar alternativas al uso de antibióticos. Para ello, es esencial entender cuál es el efecto de los antibióticos en heridas abiertas, la magnitud de la problemática de las resistencias bacterianas y qué sustancias sintéticas o naturales funcionan para prevenir una infección en estas circunstancias.

### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

De todo lo explicado anteriormente se deduce la necesidad de revisar el uso de los antibióticos en las heridas cerradas por segunda intención en caballos, en un intento de racionalizar su administración por la relevancia actual de las resistencias microbianas. Por tanto, este Trabajo Fin de Grado consistirá en realizar una revisión bibliográfica con los siguientes objetivos:

- 1)** Describir los efectos de los antibióticos tópicos y sistémicos en heridas abiertas, tanto en términos de efectividad como de efectos adversos.
- 2)** Revisar el impacto de las resistencias antibióticas existentes y detallar los mecanismos por los que se producen.
- 3)** Recopilar información sobre los principales tratamientos antimicrobianos alternativos de eficacia probada en este tipo de heridas.

### **4. METODOLOGÍA**

Para alcanzar los objetivos propuestos se ha realizado una revisión bibliográfica en la que se han incluido tanto artículos como actas de congresos de sociedades veterinarias profesionales y

científicas relacionadas, además de libros básicos de editoriales científicas especializados en el tratamiento de heridas en caballos. Las herramientas empleadas para la búsqueda de la información han sido los motores de búsqueda de artículos de investigación biomédica (Web of Science, Pubmed, Elsevier, y Google Scholar). Para manejar la bibliografía se ha utilizado el gestor de referencias bibliográficas Mendeley. Las principales palabras clave introducidas en los motores de búsqueda han sido: *wound management*, *open wound*, *bacterial resistance*, *antimicrobial treatment*, *antimicrobial alternatives*, *horse*. La búsqueda se ha realizado únicamente en inglés y han sido descartados aquellos artículos que trataban sobre heridas implicando estructuras sinoviales, fracturas, infección ósea y/o tejido de granulación exuberante y sus tratamientos concretos, además de las heridas cicatrizadas por primera intención o primera intención retardada.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El manejo clínico de las heridas en caballos puede convertirse en una tarea frustrante, cara y persistente en el tiempo que frecuentemente requiere cambios a lo largo del tratamiento<sup>18</sup>. La infección es el inhibidor más común de la cicatrización de las heridas y el que mayor preocupación crea entre los profesionales sanitarios y los propietarios de los caballos. Es por eso que los veterinarios, ante una herida abierta, tienden a administrar de forma sistemática tratamientos antibióticos, tópicos o sistémicos, para prevenir una posible infección, sin tener en cuenta en ocasiones si su uso va a ser efectivo o si puede haber consecuencias perjudiciales para el animal o para la Salud Pública<sup>17</sup>.

Para elegir con criterio el tratamiento más adecuado y discernir si la antibioterapia es realmente necesaria, se debe individualizar cada herida en sus circunstancias y sobre todo, debe tenerse en cuenta en qué fase de la cicatrización se encuentra. Por tanto, previamente debe definirse qué se entiende por “heridas cicatrizadas por segunda intención” y cuáles son las fases de cicatrización de las mismas para comprender mejor cómo afecta cada sustancia a la curación de una herida abierta.

### **5.1 Fases de la cicatrización**

Las fases de la cicatrización se dividen generalmente en hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. Debido a que estas fases se superponen y ocurren simultáneamente en todos los componentes tisulares, distinguir unas de otras es difícil (Figura 1). En consecuencia, esta división se aplica en el ámbito académico y de investigación, pero en el ámbito clínico las fases de la cicatrización se dividen de tal manera que, aunque también se superponen, ocurre una fase después de la otra y de una forma más o menos separada en el tiempo. Dicha clasificación

comprende las fases de inflamación, formación del tejido de granulación, contracción y epitelización, con la ventaja de que el veterinario puede observarlas de forma macroscópica<sup>19</sup>. Por ello, será esta clasificación la que se presentará y utilizará en este Trabajo Fin de Grado.

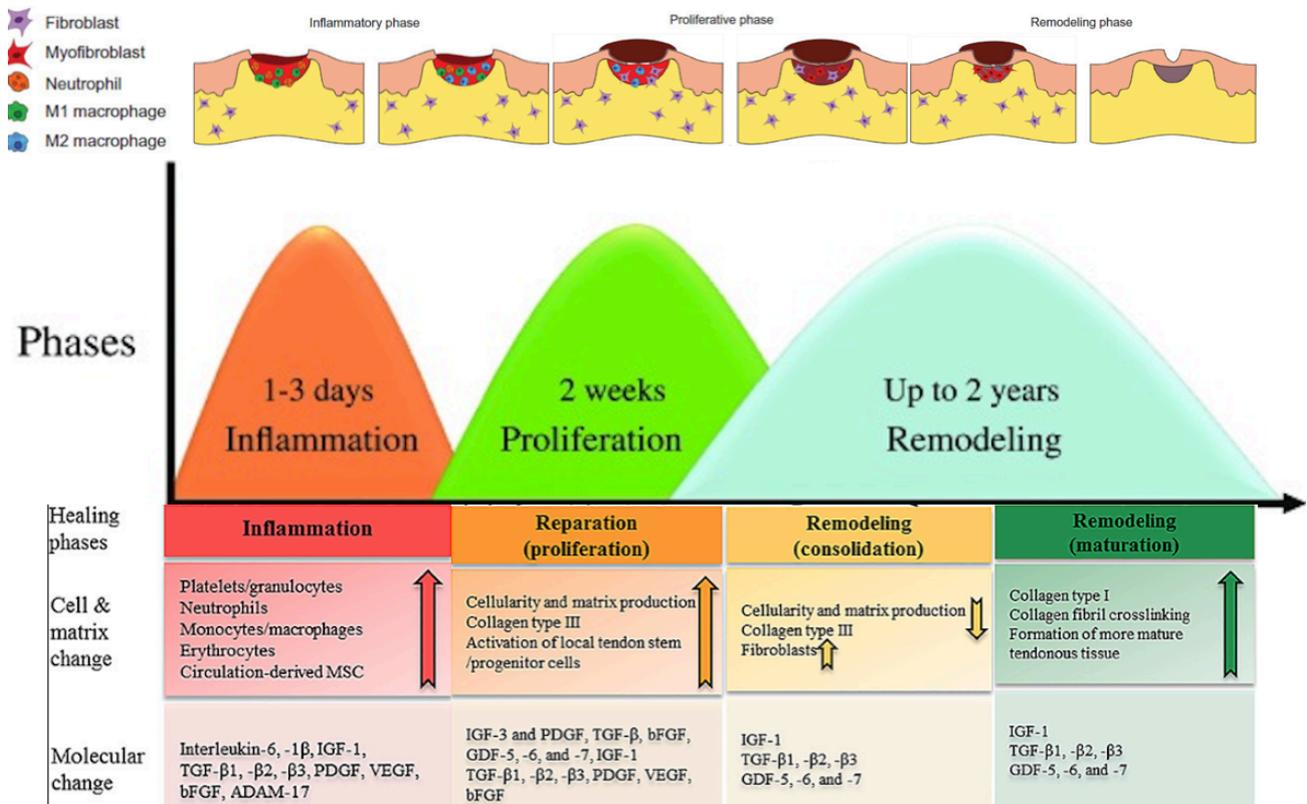


Figura 1. Perfil temporal de las fases sincronizadas de la cicatrización (centro), con un resumen de los principales eventos (abajo) y el aspecto de la herida (arriba) en cada fase cicatricial. (Modificado por Laia Ferrer desde las fuentes Hamilton et al., 2015; Maxson et al., 2012; Schneider et al., 2018).

### 5.1.1 Inflamación

Esta fase empieza en el momento de la lesión y la magnitud de la inflamación va correlacionada con la severidad del trauma. En esta fase, las células blancas migran al tejido dañado: los neutrófilos ayudan a destruir bacterias y limpiar los detritos en la fase aguda de la inflamación, pero son los macrófagos los que ocuparán la mayor parte de la etapa<sup>20</sup>. Los neutrófilos liberan especies reactivas de oxígeno, como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros radicales O<sup>-</sup> necesarios para la eliminación de bacterias tras la fagocitosis. Al mismo tiempo, los macrófagos producen mediadores de la inflamación como el factor de necrosis tumoral (TNF)-α, interleucina (IL)-1 y factor de crecimiento transformante (TGF)-β, además de otros factores de crecimiento, todos ellos esenciales para el refuerzo de la respuesta inflamatoria, de la inducción de la fibroplasia y de la contracción de la herida. Esto permite que el tejido no viable se desbride mejor, preparando un lecho sano para que se forme el tejido de granulación<sup>19</sup>.

### 5.1.2 Formación de tejido de granulación

Esta fase se correspondería con la fase proliferativa clásica, durante la cual el tejido de granulación empieza a rellenar el defecto generado por la herida. En esta fase también comienza la neovascularización, y la abundancia de estos nuevos vasos sanguíneos entre el estroma fibroblástico le da al tejido de granulación un aspecto característico como el que se muestra en la imagen<sup>20</sup> (Figura 2).



*Figura 2.* Aspecto rosáceo típico que presenta un tejido de granulación sano. *Fuente:* Óscar Jiménez.

### 5.1.3 Contracción

La contracción de la herida se produce como resultado de la combinación de las fuerzas de tracción generadas por la migración de los fibroblastos y de la acción de un fenotipo de fibroblastos especializado: los miofibroblastos. La capacidad de los fibroblastos para contraerse viene determinada por su interacción con los mediadores de la inflamación. Por ejemplo, TGF- $\beta$  induce la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos y la liberación de los factores necesarios para la contracción, determinando por tanto la fuerza contráctil ejercida por estos. En esta fase, también es determinante la disposición de los miofibroblastos en un patrón regular, que debe ser perpendicular a los vasos y paralela a la superficie de la herida, así como la rapidez con la que se organicen los mismos<sup>19</sup>.

### 5.1.4 Epitelización

Finalmente, el defecto termina cubriéndose gracias a la proliferación de células epiteliales. Aproximadamente a partir de la tercera semana desde la lesión, se produce una correlación inversa entre la epitelización y la contracción, es decir, cuanta menor contracción, mayor

epitelización. Por tanto, si la contracción de la herida es rápida, la epitelización se ralentiza. La epitelización conlleva la formación de la cicatriz, que se caracteriza por ser un tejido de mayor fragilidad que la piel sana, con peor adhesión a la membrana basal subyacente, sin anejos epiteliales y de peor estética<sup>19</sup>.

## **5.2 Clasificación de las heridas**

### **5.2.1 Heridas cicatrizadas por cierre primario**

El cierre primario hace referencia a la sutura de los bordes de la herida inmediatamente después de limpiarla, desbridarla, y si es necesario, colocar un drenaje apropiado e inmovilizar la zona donde se encuentra<sup>21,22</sup>. Si la evolución es exitosa y sin complicaciones, este tipo de cicatrización es la que resulta más estética y funcional para el caballo, ya que se cubre el defecto, se protege la zona de la contaminación y disminuye la cantidad de tejido de reparación necesario para la reestablecer la integridad de la piel<sup>23</sup>. Este tipo de cicatrización suele elegirse para heridas recientes y mínimamente contaminadas, con un buen riego sanguíneo, con poca pérdida de tejido y una tensión mínima en los bordes de la herida<sup>21</sup>.

### **5.2.2 Heridas cicatrizadas por cierre primario retardado**

En ciertas situaciones, como alternativa a la cicatrización por cierre primario, la sutura puede retrasarse unos pocos días (de 1 a 3 días) para permitir una mejor preparación del lecho de la herida, tratándose entonces de un cierre primario retardado<sup>21</sup>. Se aconseja en heridas que en principio eran aptas para un cierre primario, pero se encontraban muy contaminadas o excesivamente inflamadas, lo que llevaría a una dehiscencia en caso de suturarse. También está indicado en pacientes que han tenido una pérdida sustancial de sangre o un shock post-traumático y es necesario priorizar su estabilización<sup>23</sup>. Uno de los problemas más importantes de este tipo de cicatrización es que la herida empieza a expandirse debido a la inflamación que tiene lugar en los primeros días, lo que puede imposibilitar el posterior cierre total del defecto. Pese a estos inconvenientes respecto al cierre primario, esta situación es preferible a la cicatrización por segunda intención<sup>19</sup>.

### **5.2.3 Heridas cicatrizadas por segunda intención**

La mayoría de casos en que el cierre primario o el cierre primario retardado no son factibles se deben a que la herida está extremadamente contaminada y/o ha sufrido una pérdida importante de tejido, como ocurre en las quemaduras. La aposición de los bordes, por lo tanto, no es posible y las heridas deben seguir el proceso natural de cicatrización. Este tipo de reparación se denomina cicatrización por segunda intención<sup>21</sup>. También seguirán este proceso

aquellas heridas tratadas por cierre primario que presenten dehiscencia parcial o total de la sutura, debida por ejemplo a la alta movilidad de la zona por estar situada cerca de una articulación y no poder inmovilizarse<sup>23</sup>. La cicatrización por segunda intención requiere frecuentes intervenciones para estimular y controlar el proceso de curación, ya que el cierre completo requiere un tiempo más prolongado. La cicatrización por segunda intención no es la situación ideal debido a que las heridas en caballos tienden a cerrar mediante epitelización antes que con contracción, sobre todo en las extremidades<sup>24</sup>. Esto conlleva la formación de una cicatriz más extensa y débil (solo posee el 60% de la fuerza de rotura de la piel sana intacta), en la que los anejos de la piel (pigmentación, pelos, glándulas sudoríparas y sebáceas) no se regeneran<sup>25</sup>.

#### **5.2.4 Heridas cicatrizadas por segunda intención retardada**

Una vez que el tejido de granulación sano creado durante la cicatrización por segunda intención se encuentra rellenando el defecto, es posible intentar aproximar y suturar los bordes de la herida, lo que se conoce como cicatrización por segunda intención retardada<sup>21</sup>. El objetivo es acelerar el proceso de curación, evitando la formación de tejido de granulación exuberante, e intentar que el resultado sea estética y funcionalmente mejor. Suele aplicarse en heridas considerablemente contaminadas o infectadas que han sido previamente manipuladas por el propietario, o en heridas crónicas. En ningún caso puede elegirse esta cicatrización en heridas con mucha tensión en la piel, como el metacarpo o el metatarso, o que se caractericen por una importante pérdida de tejido<sup>21,26</sup>.

### **5.3 Factores que impiden o retrasan la cicatrización**

La cicatrización de las heridas es una serie de eventos orquestados de forma delicada que van unidos en tiempo y espacio en el proceso, conllevando en última instancia la reparación del defecto. La progresión de la cicatrización puede verse afectada por varios factores que influyen en el microambiente de las heridas y que pueden interferir en el desarrollo fisiológico de la curación de las mismas<sup>27</sup>. Estos pueden dividirse en factores intrínsecos, referidos a las particularidades que presenta el proceso de cicatrización en el caballo, y factores extrínsecos, los cuales son externos al animal.

#### **5.3.1 Factores intrínsecos**

Para optimizar el proceso de curación de las heridas en équidos, el veterinario debe tener en cuenta que la respuesta a una lesión es diferente en los caballos respecto a otras especies e incluso dentro de la misma especie. En primer lugar, la respuesta inflamatoria inicial al trauma en el caballo es más lenta y menos intensa que por ejemplo en el poni<sup>27</sup>. Esto conlleva que los

leucocitos persistan durante más tiempo, y por tanto liberen mediadores y productos tóxicos que dificultan la epitelización<sup>19</sup>. Además, la zona donde se produce la lesión en estos animales es importante. Las heridas del tronco, cabeza y cuello cicatrizan mejor y más rápidamente que aquellas que se producen en las extremidades<sup>28</sup>. Una causa que puede explicar este hecho es la hipoxia que se produce en estas zonas debido a su anatomía, ya que las extremidades poseen sólo dos arterias principales que llegan a las regiones más distales. Otra causa clara es que la piel de las extremidades soporta una mayor tensión y es más fina que en el resto del cuerpo, lo que produce que en la fase de epitelización la cicatriz que se forma sea más extensa debido a una menor contracción<sup>29</sup>. Además, las extremidades son zonas propensas a que se produzca tejido de granulación exuberante<sup>27</sup>, debido a los mediadores inflamatorios y su interacción con otros factores, que promueven la proliferación de los fibroblastos de manera descontrolada y que se siga sintetizando tejido de granulación hasta que sobrepasa el nivel de la piel<sup>19</sup>. La menor contracción y la hipoxia también influyen en la desregulación del proceso apoptótico<sup>30,31</sup>. En consecuencia, la herida aumenta de tamaño drásticamente<sup>19</sup>.

### **5.3.2 Factores extrínsecos**

Existen factores que pueden interrumpir la cicatrización y paralizarla en alguna de sus fases al modificar el ambiente que rodea a la herida. Es el caso de los cuerpos extraños de muy pequeño tamaño, el movimiento constante del área afectada que no deja que el tejido que está cicatrizando se adhiera al tejido subyacente, el trauma repetido en la misma zona debido a la irritación de la herida por otros motivos y su consecuente rascado por parte del animal, el exceso de tejido necrótico o la amplia pérdida de tejido durante el trauma. Pero sin duda, el inhibidor de la cicatrización en caballos más común es la infección. Una infección bacteriana bien establecida causa alteraciones específicas en la respuesta inflamatoria convirtiendo el proceso de curación en un proceso destructivo que evita la reparación natural del epitelio<sup>28</sup>.

### **5.4 Efecto de los antibióticos en las heridas cicatrizadas por segunda intención**

Las personas y los animales, incluido el caballo, convivimos con una gran cantidad de especies de flora microbiana naturalmente presentes en el organismo sin que causen ningún daño en general ni en el proceso de cicatrización en particular, tal y como corroboran estudios en modelos animales sobre el proceso de cicatrización en heridas estériles y no estériles<sup>32</sup>. Ya en 1921, Carrel estudió en perros el efecto de inocular *Staphylococcus* spp. en heridas abiertas y comprobó que curaban más rápido que las que habían sido protegidas con apósitos estériles<sup>33</sup>. Algunos estudios han relacionado la infección de las heridas con la carga bacteriana que se encuentra en ella. Las heridas en ratones inoculadas con *Escherichia coli*, a una concentración

de  $10^7$  UFC o más, terminaban infectadas, a diferencia de aquellas heridas inoculadas con  $10^2$  UFC de *E. coli*, las cuales no se infectaron<sup>34</sup>.

La flora normal comúnmente encontrada en la piel intacta está formada por microcolonias de más de  $10^5$  UFC/gramo de tejido. Por ello, se llegó a un consenso entre los profesionales sanitarios para considerar que una herida abierta está infectada cuando están presentes más de  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> de bacterias totales, ya que es un ambiente que favorece su desarrollo<sup>35</sup>. Sin embargo, en estudios posteriores se ha cuestionado esta afirmación, porque la dosis infectiva varía según el tipo de microorganismo y sus interacciones con la microflora del organismo. Estas interacciones polimicrobianas parecen jugar un papel crucial en la curación de las heridas, ya que por ejemplo, microorganismos poco invasivos *per se* pueden actuar sinérgicamente con otros microorganismos más virulentos<sup>36</sup>. De hecho, otros estudios recalcan que más que las especies en particular, es el número de especies de bacterias diferentes presentes en la herida las que se relacionan con su infección<sup>37,38</sup>.

Además de las bacterias naturalmente presentes en la piel y de aquellas que puedan colonizar la herida, así como de las interacciones entre ellas, recientemente se ha descubierto que la microbiota intestinal también influye indirectamente en la cicatrización y la infección de las heridas. En la especie humana, las situaciones como el estrés o la falta de nutrición debilitan la pared intestinal predisponiendo a una mayor translocación de bacterias al torrente sanguíneo, afectando negativamente a la resolución de las heridas<sup>39</sup>. También hay que considerar que muchas bacterias intestinales inoñas, habitualmente presentes en el tracto digestivo, pueden ser potencialmente patógenas al tener la capacidad de convertirse en fenotipos más agresivos cuando son expuestas a un entorno hostil que activa su virulencia<sup>40</sup>. Esto ocurre con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, comunes colonizadores del tracto intestinal en personas y fuentes frecuentes de infecciones en incisiones quirúrgicas. La limitación nutricional del intestino induce la conversión de *P.aeruginosa* a un fenotipo virulento y letal<sup>41,42</sup> mientras que la virulencia de *S.aureus* se activa por el trauma e isquemia tisular, determinando el grado de estos factores la severidad de las infecciones por *S. aureus* en heridas<sup>43</sup>.

A parte del potencial incremento en la patogenicidad de las bacterias colonizadoras habituales, el motivo de que la alteración de la flora microbiana intestinal sea tan importante para las heridas cicatrizadas por segunda intención es que su velocidad de curación está mediada también por el llamado eje intestino-cerebro. Un estudio en ratones descubrió que la activación del nervio vago por la microbiota intestinal hacía que se liberase la hormona oxitocina, la cual

inducía la regulación de los linfocitos T acelerando la cicatrización de las heridas<sup>44</sup>. Por tanto, la microbiota intestinal es una variable relevante en la curación de heridas y los factores que afecten a la misma podrán influir en el proceso de cicatrización. La administración de antibióticos es una de las principales causas de alteración del microbioma digestivo. De hecho, en cerdos a los que se practicaba una resección intestinal se vio que una falta de nutrición enteral sumada a la administración de antibióticos alteraba más la microbiota intestinal que la propia cirugía digestiva<sup>45</sup>.

En el caso de la especie equina, su microbiota intestinal puede sufrir profundos cambios derivados del uso de antibioterapia, como mostró un estudio valorando el efecto de 5 días de tratamiento antimicrobiano con la elección de trimetropim sulfadiacina, ceftiofur o penicilina procaínica en diferentes caballos. Además, el cese de la administración de las drogas antimicrobianas no resultó en un cambio inmediato de la microbiota a su estado original, sino que se mantuvo ligeramente alterada hasta 30 días después. La ruta de administración que más afectó a la microbiota intestinal fue la oral, aunque también se describieron cambios con las aplicaciones por vía intramuscular de penicilina procaínica y ceftiofur<sup>46</sup>. En cuanto al efecto indirecto de los antibióticos sistémicos sobre la cicatrización de heridas mediado por la alteración de la flora, se encontró en ratones que las bacterias intestinales expresaban la proteína RegIII $\gamma$ , implicada en la regulación de la proliferación y diferenciación de queratinocitos. Esta proteína decrecía en las heridas después de un tratamiento oral con vancomicina, resultando en una cicatrización más lenta respecto a los grupos de ratones control sin tratamiento<sup>47</sup>.

Toda esta información deja constancia de que existen multitud de factores que pueden influir en que la herida se infecte o no. Aunque cada vez se conoce más acerca de las complejas interacciones entre los distintos microorganismos que pueden influir en el proceso de cicatrización, actualmente la relación causal entre la presencia de los microorganismos en una herida, la microbiota natural de la piel y del aparato digestivo y el proceso de cicatrización todavía no se ha elucidado por completo<sup>32</sup>. Por tanto, es de esperar que existan discrepancias en cuanto a la elección de los antibióticos como tratamiento inicial. Otro factor que influye en una falta de consenso en cuanto al uso de antibióticos es la falta de información sobre el impacto que estos fármacos pueden tener sobre la cicatrización.

Durante la realización de la presente revisión bibliográfica, se han encontrado muy pocos estudios que expliquen y definan el efecto de los antibióticos en la cicatrizaición de las heridas. En cuanto a los antibióticos sistémicos, un estudio en 1974 de Martin y colaboradores utilizó un

modelo experimental en ratones en los que generaban heridas y las inoculaban con bacterias de cepas no virulentas (*Pseudomona aureginosa*, *Escherichia coli* o *Sthaphylococcus aureus*). Al administrar antibióticos del grupo de las cefalosporinas y aminoglucósidos (cefalotina, cefaloridina, cefalexina y kanamicina) por vía intramuscular, estos no podían ser detectados posteriormente en las heridas con tejido de granulación y la carga bacteriana en estas heridas se mantuvo por encima de  $10^7$  UFC. Una posible explicación a estos hallazgos que apuntaron los autores de este estudio es que, aunque la vascularización en esta fase de la cicatrización es abundante, la fibrina presente parece dificultar la penetración del antibiótico en el tejido<sup>48</sup>.

En caballos, una práctica habitual para lograr altas concentraciones de antibiótico de forma localizada es la perfusión regional. Un estudio valoró el efecto de la perfusión regional de amikacina sulfato en heridas cicatrizadas por segunda intención localizadas en las extremidades, encontrando que las heridas no tratadas y tratadas cicatrizaron correctamente y a la misma velocidad, sin signos de tejido de granulación exuberante y sin diferencias macroscópicas ni histológicas. Por tanto, el estudio concluyó que la perfusión regional con amikacina ni mejoraba ni impedía el proceso de cicatrización de heridas abiertas, aunque una limitación de este trabajo fue que no se midió la concentración de amikacina en suero ni en el lecho de la herida, lo que dificulta concluir si la amikacina es efectiva en los tejidos blandos<sup>49</sup>.

Por tanto, es lógico pensar que previamente a la aplicación de antibióticos por vía sistémica debería garantizarse que la herida está bien vascularizada y que no se encuentra en la fase de formación de tejido de granulación, o la concentración mínima inhibitoria (CMI) no se alcanzará en el lecho de la herida<sup>18,50</sup>. La administración de antibióticos sistémicos está justificada cuando el grado de infección excede los esfuerzos locales por controlar la carga bacteriana, cuando el tejido blando local muestra infección o cuando hay signos aparentes de sepsis<sup>51</sup>. Normalmente se recomienda su uso para infecciones de la piel que cubran amplias áreas del cuerpo, donde el folículo piloso y la piel de alrededor estén involucrados<sup>50</sup>.

En relación a los antibióticos tópicos, se han encontrado muy pocas evidencias de su efectividad<sup>52</sup> y no existen test específicos estandarizados aprobados por ninguna agencia para medir la eficacia de las terapias tópicas<sup>53</sup>. Sin embargo, en el mercado encontramos numerosas formulaciones antibióticas tópicas desarrolladas para aplicarse en heridas y su uso es muy popular<sup>54</sup>.

En un estudio de 1985 se valoró la toxicidad de los agentes antimicrobianos tópicos bacitracina, neomicina sulfato y kanamicina sulfato sobre fibroblastos cultivados *in vitro*, sin que ninguno de ellos resultara tóxico<sup>55</sup>. Sin embargo, en medicina humana, los últimos estudios apuntan a que la aplicación rutinaria de cremas antibióticas no mejora la curación de las heridas en caso de no

estar clínicamente infectadas<sup>54</sup>. Por ejemplo, se estudió comparativamente una crema a base de vaselina sin antibióticos, y otra crema con polimixina B, bacitracina, gramicidina y lidocaína, sobre heridas ocasionadas en un procedimiento para la retirada de queratosis seborreica. Se demostró que no hubo diferencias entre ratios de infección ni una mejor cicatrización entre las cremas con o sin antibióticos<sup>56</sup>.

Los resultados de los estudios en caballos sugieren que el efecto de los antibióticos en pomada es nulo en cuanto a su aumento en la rapidez y/o mejora de la cicatrización. Bischofberger y colaboradores compararon el tratamiento de heridas asépticas inducidas en caballos utilizando miel de Manuka, vaselina, y la pomada triple antibiótica (polimixina B, neomicina y bacitracina), encontrando que las aplicaciones de las dos últimas producían un retraso en el proceso de cicatrización de las heridas y aumentaban su tamaño<sup>57</sup>.

De forma similar, se comparó el tratamiento con sulfadiazina de plata en crema, la pomada triple antibiótica y nanoemulsiones hiperosmolares, sobre heridas inducidas y contaminadas al inicio del estudio con *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, en una concentración de 10<sup>6</sup> UFC. Ningún tratamiento aceleró el cierre de la herida en comparación a las heridas control no tratadas<sup>58</sup>.

Así pues, recopilando la evidencia limitada de su efectividad sobre todo en la especie equina, debería evitarse el uso de antibióticos tópicos para tratar heridas abiertas de estos animales cuando no hay signos de infección o si ya se ha formado tejido de granulación. Estas cremas habitualmente seleccionan bacterias resistentes que colonizan la herida y por tanto su pequeño o nulo efecto positivo no compensa el riesgo de crear más resistencias antimicrobianas<sup>52</sup>.

### **5.5 Resistencias a antibióticos de las bacterias habituales de la piel**

Las resistencias antimicrobianas se conocen en caballos desde 1970<sup>59</sup>. La resistencia a los antimicrobianos se puede definir como la capacidad de un microbio para sobrevivir y reproducirse a las concentraciones más altas de un antimicrobiano que se puedan lograr en los tejidos corporales<sup>60</sup>. Los factores que contribuyen al aumento de las resistencias antibióticas son múltiples y complejos, pero se ha demostrado que el número de bacterias multirresistentes está directamente relacionado con los niveles de antibióticos empleados<sup>52</sup>. Un buen ejemplo de esta afirmación es un estudio que recogió información en 100 países donde la mupirocina estaba disponible, detectando en todos ellos cepas de *S.aureus* resistentes a este antibiótico. En cambio, en Noruega, donde la mupirocina no estaba autorizada, no se encontró ninguna cepa resistente frente a este antibiótico<sup>61</sup>. También en Brasil, la prevalencia de cepas de *S.aureus*

resistentes a mupirocina disminuyó progresivamente durante 5 años desde la restricción de su uso en el país<sup>61,62</sup>.

Si las resistencias van vinculadas al elevado uso de antibióticos, utilizarlos de forma indiscriminada contribuye a exacerbar el fenómeno de las bacterias multirresistentes. Los datos del Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades de Estados Unidos mostraron que, de los pacientes que recibieron antibióticos durante su estancia en el hospital, el 37,2% de esas prescripciones eran innecesarias o podrían haberse mejorado<sup>63</sup>. En el caso de las heridas en caballos, un 84% de los veterinarios equinos encuestados en Alemania, Suecia y Austria prescribirían antibióticos como primera opción para tratar una herida infectada que no implicara estructuras sinoviales<sup>64</sup>.

Todos los antibióticos empleados en medicina veterinaria son los mismos, o están estrechamente relacionados, a los antibacterianos utilizados en medicina humana, o bien pueden inducir resistencias cruzadas<sup>65</sup>. Datos de encuestas alrededor de Europa indican que los veterinarios prescriben, dependiendo de la especie, el país y la enfermedad, de un 13% a un 30% de antimicrobianos de uso reservado para las infecciones en personas<sup>66</sup>. En el caso de la especie equina, se han documentado resistencias a vancomicina e imipinem, antibióticos que se reservan en veterinaria únicamente para su uso en patógenos multirresistentes, lo que sugiere que no se están administrando de forma apropiada<sup>67</sup>.

Con el objetivo de disminuir la cantidad de antibióticos prescrita, algunas asociaciones veterinarias de países de la UE han creado guías de terapias antibióticas a nivel estatal que determinan el uso racional y correcto de antibióticos especificándose las pautas a seguir en cada patología. La Asociación Federal Alemana de Veterinarios (BTK) y el grupo de trabajo de Jefes de Servicios Veterinarios (ArgeVet) establecieron unas directrices para el uso prudente de antibióticos en animales, con el fin de reducir su uso a lo indispensable. Tan solo 4 años después, se produjo una reducción de un 73% de la prescripción de antibióticos<sup>65</sup>. Otra medida que suele acompañar a las guías de terapias antibióticas es el endurecimiento de las exigencias de registro del uso de antibióticos estipulado en la legislación del país, consiguiendo reducir el uso de antibióticos en situaciones innecesarias y, por tanto, las resistencias a dichos antibióticos<sup>65,68</sup>.

La insistencia por parte de las autoridades y colectivos sanitarios hacia la disminución de las infecciones por bacterias multirresistentes se debe a que estas obligan a prolongar el tratamiento, lo que va asociado a mayores efectos secundarios. En consecuencia, el coste del tratamiento aumenta sustancialmente y se prolonga el malestar del paciente. Sin embargo, el

mayor peligro de los patógenos multirresistentes es que pueden infectar tanto a animales como a humanos, considerándose que su transmisión es zoonótica y a menudo en las dos direcciones. Es el caso de las cepas resistentes de *S. aureus*, de las que se han notificado transmisiones de persona a caballo y viceversa a través de veterinarios<sup>69,70</sup>. Este hecho tiene repercusiones importantes para la Salud Pública, de modo que requiere el control global de las infecciones y la educación de los veterinarios en el concepto “One Health”<sup>8</sup>.

Para entender el calibre de la problemática de resistencias antibióticas en los caballos, un estudio en Holanda ilustró la situación que actualmente se afronta en la clínica equina. Los investigadores examinaron la tendencia de la susceptibilidad a antimicrobianos de 1091 bacterias aisladas de 588 potros con sepsis, entre 1979 y 2010, y encontraron que disminuyó la susceptibilidad de enterobacterias (*E.coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., etc.), *Actinobacillus* spp., y *Streptococcus* spp.  $\beta$ -hemolíticos frente a gentamicina; las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de amikacina aumentaron para ése mismo grupo de bacterias, es decir, se requirió una dosis más alta para conseguir efecto bactericida. Del mismo modo, la susceptibilidad de enterobacterias para el ceftiofur fue inferior, y los valores de la CMI aumentaron para *Enterococcus* spp. y *Pseudomonas* spp. Al igual que la CMI de la ceftizoxima también aumentó contra enterobacterias. Además el ticarceillin-clavulánico aumentó su CMI frente a *Enterococcus* spp. Y por último la resistencia de *Enterococcus* spp. frente al imipenem aumentó en los últimos años<sup>71</sup>.

En caballos adultos, se han descrito cepas de bacterias multirresistentes que habitan en la piel y que son protagonistas habituales de las infecciones crónicas y reincidentes. Por orden de relevancia, se encuentran las siguientes variantes patógenas: *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* meticilina-resistente (SARM y SERM); Cepas de *Pseudomona aeruginosa* resistentes a los antibióticos más comúnmente utilizados ( $\beta$ -lactámicos, fluoroquinonas y quinolonas); *Enterococcus* spp. vancomicina-resistente; *E.coli* aminoglucósido-resistente; y *Actinobacillus* spp. penicilina-resistente<sup>72</sup>.

Una vez ilustrada la problemática de las resistencias bacterianas y descrita su importancia y estado actual en la especie equina, pasaremos a explicar los principales mecanismos que permiten a las bacterias desarrollar resistencia frente a los antibióticos. Los agentes antimicrobianos actúan mediante la interrupción de alguna de las funciones metabólicas específicas de las bacterias, existiendo cuatro mecanismos principales: interrupción de la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de ADN/ARN, inhibición de la biosíntesis de

proteínas o interferencia de una ruta metabólica elemental para la viabilidad de la bacteria<sup>73</sup>. Los mecanismos a través de los cuales las bacterias pueden adquirir resistencia a los antimicrobianos se agrupan en 3 categorías principales: protección o modificación de la diana de los antimicrobianos, expulsión del agente antimicrobiano del interior de la célula reduciendo su permeabilidad celular o mediante bombas de expulsión activa, y producción de enzimas que inactivan a las sustancias antimicrobianas<sup>74</sup>. Las características de los mecanismos de resistencia en función de la acción del antibiótico se han resumido en la Figura 3 y a continuación se comentarán solo los de los patógenos multirresistentes relevantes en caballos que se han listado anteriormente. La resistencia de *S. aureus* y *S. epidermidis* frente a meticilina proviene de la adquisición del gen *mecA* localizado en el elemento genético móvil conocido como complejo *mec*, que se sitúa en una isla genómica denominada *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec por sus siglas en inglés)<sup>75,76</sup>. *P. aeruginosa*, al presentar resistencia a varios tipos de antibióticos, posee varios mecanismos a la vez. Su resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos se debe a varios tipos de enzimas  $\beta$ -lactamasas que inactivan el fármaco, mientras que son las mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica la ADN girasa, las que le otorgan una elevada resistencia frente a fluoroquinolonas y quinolonas<sup>77</sup>. En el caso de *Enterococcus* spp., su resistencia frente a aminoglicósidos se basa en la acción de la enzima bifuncional AAC(6'), con actividad fosfotransferasa y de acetilación<sup>78</sup>. Por último, la bacteria *Actinobacillus* spp. expresa enzimas  $\beta$ -lactamasas codificadas por el gen *bla<sub>ROB-1</sub>* como mecanismo de resistencia a la penicilina<sup>79</sup>. Los mecanismos de resistencia pueden ser intrínsecos a las bacterias, o bien representar mecanismos adquiridos que se encuentran solo en algunos miembros de un género o especie, como consecuencia de alguna alteración en el genoma bacteriano<sup>80,81</sup>. Independientemente de su origen específico, los mecanismos de resistencia adquirida a los antimicrobianos son preocupantes, ya que permiten la aparición y la rápida diseminación de la resistencia en poblaciones bacterianas previamente susceptibles. Es importante destacar que la mayoría de los mecanismos de resistencia microbiana conocidos se han documentado en aislamientos bacterianos de équidos<sup>82</sup>.

Adicionalmente a las resistencias adquiridas por los diferentes mecanismos explicados, otro factor que dificulta la acción de los antibióticos en las heridas es que estas presentan un ambiente húmedo y rico en proteínas ideal para la formación de *biofilms*<sup>83</sup>. Las bacterias han desarrollado la capacidad de establecer relaciones parásitas con su hospedador a través de la formación de *biofilms* con el fin de preservar su integridad<sup>84</sup>. Un *biofilm* se define como una comunidad de bacterias adheridas, rodeadas y protegidas por una matriz de exopolisacáridos que ellas mismas producen y que se compone concretamente de polisacáridos, DNA

extracelular, proteínas y lípidos<sup>85,86</sup>. Dentro del *biofilm*, las bacterias se sustentan y protegen a través de canales que permiten el paso de nutrientes, gases y el intercambio de moléculas químicas señalizadoras mediante las que son capaces de comunicarse (*quorum sensing*, o autoinducción)<sup>84</sup>.

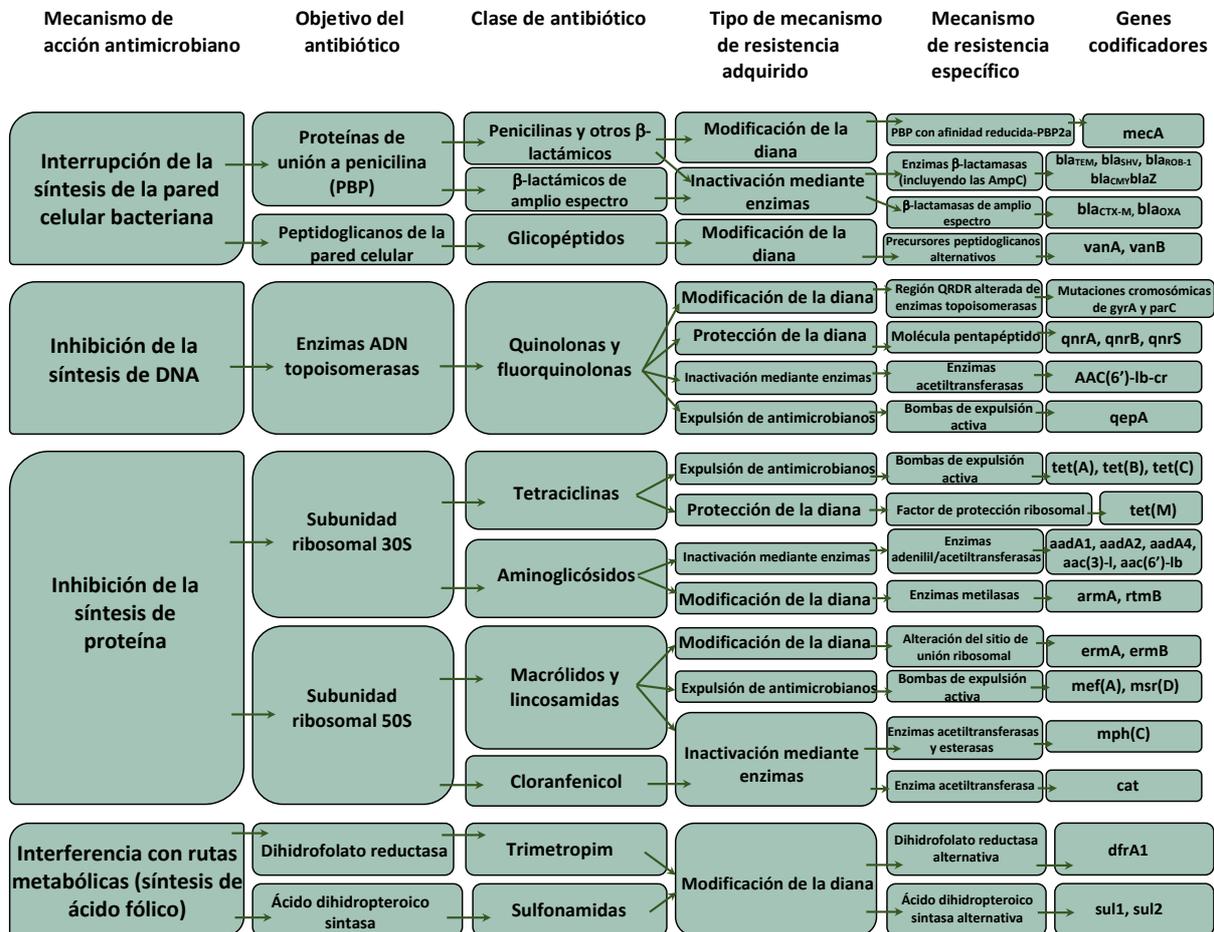


Figura 3. Resumen de los mecanismos de acción de los antibióticos, de los mecanismos de resistencia adquiridos frente a ellos por los microorganismos, y de los genes que los codifican. (Adaptación de Maddox et al., 2015; Matter et al., 2007)

Está demostrado que la presencia de *biofilms* retrasa la cicatrización<sup>87,88</sup>. Un estudio realizado con ratones a los que se les inoculaba o bien *S. aureus* o bien *S. epidermidis* en heridas experimentales, demostró que la re-epitelización era más lenta en aquellas en las que se formaban *biofilms*<sup>89</sup>. Además, los *biofilms* conllevan un aumento inherente de las resistencias a los agentes antimicrobianos y a la respuesta inmune del hospedador<sup>84,87,90</sup>. Por ejemplo, en el caso de *Staphylococcus aureus* se ha visto que su resistencia a los antimicrobianos es más de 100 veces mayor cuando crece en el interior de un *biofilm* que cuando prolifera libre en el medio<sup>91</sup>.

Los *biofilms* no se pueden ver a simple vista, pero suelen estar presentes en heridas crónicas donde la cicatrización se retrasa<sup>84</sup>. Freeman y colaboradores describieron los primeros *biofilms*

en caballos hace relativamente poco tiempo<sup>92</sup>. Posteriormente, se evaluó la posibilidad de que las bacterias patógenas que se encontraban en heridas crónicas de pacientes equinos formaran *biofilms*. Tras aislar estas bacterias, se midió su habilidad para adherirse a una superficie de poliestireno, equiparándolo con su capacidad de formar *biofilms*. El resultado fue que la mayoría de especies bacterianas que se encontraban en heridas crónicas mostraron alguna disposición a esta propiedad, sugiriendo que este mecanismo adaptativo de formar *biofilms* se da, en diferentes grados, en la mayoría de las bacterias que colonizan una herida crónica<sup>90</sup>.

El mayor problema de las heridas en las que se producen *biofilms* es que la mayoría van acompañadas de cepas de bacterias resistentes a antimicrobianos<sup>90</sup>. Además, la aplicación de antibiótico tópico no suele funcionar, ya que no consiguen penetrar en el *biofilm* y a menudo debe establecerse una estrategia terapéutica que combine diferentes tratamientos físicos y químicos<sup>93,94</sup>. Es el ejemplo de heridas que presentan *biofilms* de *Staphylococcus spp.*, donde se ha visto que la vancomicina por vía sistémica no alcanza la CMI suficiente en el lecho de las heridas en personas, y sin embargo es el tratamiento de elección para las infecciones con cepas SARM<sup>95,96</sup>. Por ello, es importante tener en cuenta la preparación del lecho en las heridas crónicas mediante, desbridamiento quirúrgico, para prevenir y controlar la formación de *biofilms*<sup>97</sup>.

Así pues, cuando el clínico se encuentra frente a una herida crónica con un retraso en su cicatrización, cabe pensar que seguramente presente *biofilms* y puede que también cepas de bacterias resistentes<sup>93</sup>. Por ello, en estas situaciones, deben conocerse las estrategias terapéuticas que logren eliminar el *biofilm* y seleccionar los antimicrobianos correctos para conseguir reanudar la cicatrización fisiológica de la herida.

## **5.6 Tratamientos antimicrobianos alternativos al uso de antibióticos en heridas cicatrizadas por segunda intención**

### **5.6.1 Materiales y sustancias coadyuvantes del proceso de cicatrización**

Habitualmente, antes de poder aplicar cualquier tratamiento antimicrobiano sobre una herida, hace falta acondicionarla, a veces mediante desbridado, reduciendo los exudados o hidratando el lecho de la herida. El objetivo es conseguir un ambiente húmedo y cálido que asemeje las condiciones fisiológicas de la cicatrización<sup>98</sup>. A este tipo de manejo terapéutico de heridas se le denomina cura en ambiente húmedo. Un exudado moderado en el lecho de la herida proporciona factores de crecimiento, metaloproteinasas y citoquinas<sup>99</sup>.

Con la finalidad de conseguir reestablecer el equilibrio fisiológico en el microambiente de la superficie de la herida, es muy común utilizar diferentes apósitos según la situación concreta de

cada lesión. Todos los apósitos presentan al menos una de estas acciones: protección, absorción, desbridado y/o evaporación<sup>98</sup>. Los apósitos más utilizados y más conocidos se han sintetizado en la Tabla 1. Aunque su uso está extendido y resultan de gran ayuda a la cicatrización, los apósitos no se presentarán con mayor detalle ya que no poseen eficacia antimicrobiana directa y este Trabajo de Fin de Grado pretende abordar las alternativas más importantes y eficaces al uso de los antibióticos tópicos y sistémicos. Los apósitos que contienen propiedades bactericidas se han considerado como sustancias antimicrobianas en el siguiente apartado.

Tipo de apósito	Descripción	Función principal	Fase de la cicatrización y tipo de herida recomendadas
<b>Gasas y apósitos tipo gasa</b>	Algodón prensado, o además, recubierto de una fina capa no adherente de poliuretano con poros	Absorber exudados y traspasarlos a la siguiente capa del vendaje	Para desbridar heridas necróticas poco complicadas o proporcionar protección estéril a incisiones quirúrgicas
<b>Chitina y chitosan</b>	Polisacáridos derivados de hongos, levaduras y el exoesqueleto de algunos crustáceos	Estimular la inflamación y la hemostasia	Para heridas con hemorragia o en las primeras fases de la cicatrización
<b>Alginato</b>	Fibras de sales de calcio provenientes de ácido algínico, manurónico y glucurónico derivados de algas marinas	Absorber exudados (hasta 20 veces su peso), promover la hemostasis, la inflamación, la desbridación autolítica y la formación de tejido de granulación	Indicado en heridas en fase inflamatoria o proliferativa, que presenten mucha cantidad de exudado
<b>Hidrofibra</b>	Fibras finas de celulosa que se carboximetilan para formar carboximetilcelulosa	Absorber exudados y formar un gel que retiene todos los fluidos sin permitir maceración	Indicado para heridas en fase inflamatoria o proliferativa, que presenten mucha cantidad de exudado
<b>Hidrogel</b>	Entramado 3D de polímeros hidrofílicos con un alto contenido en agua (90-95%)	Hidratar la herida, promover la desbridación autolítica y disolver la cicatriz seca y el tejido necrótico	Para heridas en la fase inflamatoria, agudas o dolorosas, en necróticas o secas, o con exposición de hueso
<b>Hidrocoloide</b>	Unión de carboximetilcelulosa, gelatina y pectina, recubierto de poliuretano	Absorber exudados y formar un gel oclusivo que retiene los fluidos facilitando la desbridación autolítica	Para heridas en la fase inflamatoria o proliferativa sin elevada cantidad de exudado
<b>Foam</b>	Espuma hidrofílica de poliuretano, semipermeable. Algunas llevan una fina capa de silicona	Formar una barrera impermeable a los microorganismos y aportar humedad	Indicado en heridas sencillas con tejido de granulación sano, sin exudado, superficiales
<b>Capa de gel de silicona</b>	Silicona	Prevenir o reducir la formación de tejido exuberante en caballos	Indicado en heridas con tejido de granulación exuberante o con riesgo de formarse

Tabla 1. Descripción de los apósitos más relevantes, función principal para la que se utilizan y características de la herida en la que se recomienda su aplicación. Fuente: (Jacobsen, 2017)

### 5.6.2 Sustancias alternativas al uso de antibióticos

A continuación, se abordarán distintas alternativas al uso de antibióticos que se han clasificado según la naturaleza de su origen, y que se recogen en la Tabla 2.

#### • Tratamientos biológicos

##### Terapias celulares

El uso de células madre mesenquimales (MSCs) se está estudiando en caballos principalmente por su capacidad para promover la reparación de diversos tejidos, incluida la piel, con buenos resultados. Así lo demuestran estudios como el de Textor et al., en el que demostraba que la inyección local de MSCs alogénicas equinas derivadas de cordón umbilical (eUC-MSC) mejoraba la cicatrización en un modelo de herida en extremidades de caballos, incluyendo mejoría histológica más temprana de las heridas tratadas respecto a las control<sup>100</sup>. Además de su función promotora de la reparación de tejidos, recientemente también se han empezado a atribuir

propiedades antimicrobianas a las MSCs. En un estudio *in vitro* se vio que las MSC inhibían el crecimiento de *E.coli* y *S.aureus* y que despolarizaban las membranas de estas bacterias. En el mismo estudio, se detectó la presencia de 4 péptidos antimicrobianos distintos, lo cual sugiere que la actividad antimicrobiana de las MSCs podría deberse, al menos en parte, a la producción de estos compuestos<sup>101</sup>.

El plasma rico en plaquetas (PRP) es una concentración de sangre autóloga que contiene más de 30 factores de crecimiento que ayudan, entre otras acciones, mejorar la cicatrización. Tiempo atrás, se ha descrito su capacidad de generar metabolitos de radicales de oxígeno, incluidos superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales libres hidroxilo, contribuyendo a la eliminación de bacterias. Además, las plaquetas interactúan directamente con los microorganismos, contribuyen a la eliminación de patógenos del torrente sanguíneo y participan significativamente en la citotoxicidad contra patógenos mediada por anticuerpos<sup>102</sup>. Recientemente, se ha descubierto que el PRP posee una actividad antimicrobiana más significativa de lo que se creía. En un estudio donde se cultivaron cepas de SARM, *S. aureus* sensible a meticilina, *Streptococcus* grupo A y *Neisseria gonorrhoeae*, la adición de PRP a las placas de cultivo resultó en un alto nivel bactericida frente a todas las bacterias<sup>103</sup>. Esta capacidad antimicrobiana viene definida, al igual que en las MSCs, por los péptidos antimicrobianos que posee y que en ocasiones actúan incluso de forma sinérgica<sup>104</sup>.

## Miel

La miel se ha utilizado como tratamiento tópico para las heridas abiertas durante miles de años<sup>105</sup>, pero esta práctica perdió protagonismo con el desarrollo de los antimicrobianos modernos. Sin embargo, la aparición de resistencias bacterianas ha provocado un renovado interés por su uso<sup>106</sup>. Sus propiedades antibacterianas se deben a su alta osmolaridad, su acidez (pH bajo) y a su contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que es el componente antimicrobiano predominante y cuya concentración está determinada por los niveles relativos de las enzimas glucosa-oxidasa y catalasa, sintetizadas por la abeja y en el polen de las flores<sup>107</sup>. Además, la miel también presenta componentes que no son fitoquímicos, como el Metilglioxal (MGO por sus siglas en inglés), que contribuye a la eliminación de bacterias y a raíz del cual se creó un factor con el que clasificar la acción antimicrobiana de las diferentes mieles. El “factor único de Manuka” (UMF por sus siglas en inglés), compara la actividad antimicrobiana de la miel y la de cualquier otro antiséptico frente a *S. aureus*<sup>108</sup>. Algunos estudios *in vitro* han revelado que la miel es eficaz contra el SARM, los estreptococos β-hemolíticos y los enterococos resistentes a la vancomicina<sup>109,110</sup>.

## **Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son productos volátiles producidos por el metabolismo secundario de las plantas, que se extraen de flores, semillas, hojas, frutos y raíces, y están compuestos principalmente de terpenos y terpenoides y constituyentes aromáticos y alifáticos<sup>111</sup>.

La mayoría de los metabolitos secundarios de origen vegetal se producen como resultado de las interacciones recíprocas entre plantas y microbios, que contribuyen a la supervivencia de las plantas y a su protección frente a microorganismos patógenos<sup>112</sup>. Estos compuestos ejercen una acción contra microorganismos grampositivos y gramnegativos, principalmente desintegrando las paredes y membranas celulares bacterianas, lo que lleva a la salida del contenido celular y la disfunción enzimática, causando la muerte celular<sup>113</sup>. Esta propiedad de los aceites esenciales proviene de sus componentes hidrófobos, que alteran las proteínas de la membrana celular y las estructuras asociadas y las hacen más permeables<sup>114</sup>.

En un estudio *in vitro* en que se determinó la actividad antimicrobiana de 9 aceites esenciales mediante métodos de incubación de difusión de disco y microdilución, se encontró una fuerte actividad de los aceites esenciales de tomillo y de orégano contra bacterias *Staphylococcus xylosus*, aisladas a partir de muestras de mucosa nasal de caballos<sup>115</sup>.

El aceite del árbol del té posee propiedades antimicrobianas bien documentadas, y se le atribuyen también propiedades antiinflamatorias, antifúngicas y de fibroplasia<sup>116</sup>. En un estudio evaluando su eficacia antimicrobiana en el lavado de manos con personas voluntarias, se vio que un producto que contenía un 5% de aceite del árbol del té más un 10% fue significativamente más efectivo que el jabón suave<sup>117</sup>.

El aceite de eucalipto es otro ejemplo de un extracto de planta que tiene propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales de amplio espectro, además de antisépticas, antihiperlipidémicas y antioxidantes. El 1,8-cineole o eucaliptol es el componente más importante y principal responsable de estas propiedades bioactivas<sup>6</sup>.

### **• Tratamientos físico-químicos**

#### **Polihexanida**

Para descontaminar y limpiar heridas es muy común utilizar clorhexidina en primera instancia. Este antiséptico se empezó a utilizar de forma sistemática para limpiar y desinfectar el campo quirúrgico en pequeños animales a partir de 1988<sup>118</sup>. Sin embargo, recientemente se ha documentado la resistencia de bacterias a la clorhexidina y la posibilidad de que induzca resistencia cruzada contra diferentes clases de antibióticos, incluidos los macrólidos y la vancomicina<sup>119,120</sup>. Por este motivo, en medicina humana ya se están empleando nuevas alternativas antisépticas como la polihexanida-biguanida<sup>121,122</sup>. Su mecanismo de acción es la

unión y alteración de los fosfolípidos de la membrana celular bacteriana con carga negativa (bacterias gramnegativas), ácidos teicoides (bacterias grampositivas) y peptidoglicanos<sup>123</sup>. La polihexanida-biguanida es un bactericida de efecto postantiséptico sostenido y no se ve afectada por la sangre ni las proteínas en la herida<sup>124,125</sup>. En un estudio en heridas de perros, el lavado con polihexanida logró la mejor descontaminación, inmediata y definitiva, de las heridas por mordedura, por lo que se recomienda como la solución de lavado de elección<sup>126</sup>.

### **Plata**

Cuando entra en contacto con bacterias, la plata interactúa rápidamente con los grupos sulfhidrilo en la superficie de los microorganismos y reemplaza los átomos de hidrógeno a los que van unidos, lo que resulta en la formación de un enlace sulfhidrilo-plata. Esta unión bloquea completamente la respiración y la transferencia de electrones de la bacteria<sup>127</sup>, lo que provoca un colapso de los protones de las membranas, que resulta en el bloqueo del transporte de energía en la misma y, en última instancia, en la muerte celular<sup>128</sup>. Se ha visto que su acción antimicrobiana viene promovida también por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>127</sup>. Las ROS son reactivos oxidativos de corta duración, altamente tóxicos, que causan daño a las proteínas, al ADN, al ARN y a los lípidos de los microorganismos<sup>129</sup>.

En un estudio se utilizaron, con éxito, apósitos impregnados con plata en lugar de antimicrobianos sistémicos para tratar 2 infecciones por SARM en heridas quirúrgicas de personas<sup>130</sup>. Sin embargo, debe tenerse presente el potencial de aparición de resistencia a la plata de las bacterias SARM, ya que un estudio demostró que los genes *sil*, que codifican la resistencia a la plata, se encontraron con frecuencia en bacterias aisladas de personas<sup>131</sup>.

### **Ácido bórico**

El boro es un oligoelemento que se encuentra en el suelo, el agua, las rocas y el aire. Su toxicidad se reconoció por primera vez entre los años 1800 y 1900<sup>132</sup>, pero a partir del año 2000 se reconoció su efecto positivo sobre la fisiología de los organismos<sup>133</sup>.

En un estudio *in vitro* en el que se cultivaban bacterias responsables de las enfermedades más importantes en veterinaria como *Brucella spp.*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, entre otras, se vio que el boro impedía el crecimiento de la mayoría de los géneros de bacterias y que además también tenía la capacidad de inhibir la formación de *biofilms*<sup>133</sup>. Además, el ácido bórico tiene un efecto positivo en la cicatrización de heridas gracias a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes<sup>134</sup>. Se ha observado que el ácido bórico estimulaba la proliferación celular entre un 10%-30% mediante la regulación de TNF- $\alpha$  y de la matriz extracelular, prolongándose esta acción hasta las 48 horas<sup>135</sup>.

## Ozono

El ozono es una molécula inestable formada por 3 átomos de oxígeno que pueden dividirse rápidamente en átomos de oxígeno libres, actuando como un potente oxidante que elimina microorganismos<sup>136</sup>.

Los mecanismos de acción del ozono son múltiples y todos están relacionados con el efecto antimicrobiano, la inmunorregulación, los mecanismos antioxidantes, la modificación epigenética, la analgesia y efectos vasodilatadores<sup>137</sup>. Primero, el ozono daña la membrana, la permeabilidad aumenta y las moléculas pueden entrar fácilmente en las células. Después, el rompe los ácidos nucleicos o bien los liposomas de los microorganismos. Asimismo, el ozono aumenta la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por las células inmunes del organismo para eliminar patógenos<sup>138</sup>. Existen diferentes formas de aplicar el ozono, siendo las más comunes su combinación con oxígeno o con aceites vegetales. El tratamiento de cultivos bacterianos con ozono en una mezcla gaseosa con oxígeno durante 5 minutos condujo a una inhibición completa del crecimiento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y otras cepas bacterianas (Jacobsen, 2017).

Se ha visto que la aplicación tópica en heridas abiertas de aceites vegetales ozonificados, como el aceite de oliva, proporciona una excelente desinfección y estimulación de la cicatrización<sup>140</sup>. Esto se debe a que los ácidos grasos insaturados del aceite permiten la formación de trioxolano, que representa la forma activa del ozono en estos sustratos. Esta sustancia forma compuestos que mejoran la cicatrización además de tener capacidad antibacteriana y antimicótica<sup>137</sup>.

## Presión negativa

La terapia de cierre asistido por vacío (VAC), también conocida como sistema de presión negativa, consiste en aplicar presión subatmosférica a una herida a través de un apósito adhesivo colocado sobre una espuma de éster de poliuretano con poros<sup>106,141</sup>. Se crea una presión negativa que puede aplicarse de manera intermitente o constante a  $-125\text{mmHg}$ <sup>142</sup>.

La función principal de la terapia VAC es la de incrementar el flujo sanguíneo local, así como estimular la proliferación celular en respuesta al estrés mecánico ejercido<sup>142</sup>. Este sistema también contribuye a eliminar el exudado de la herida<sup>143</sup>, siendo el resultado final de estos mecanismos una mayor velocidad en la formación de tejido de granulación<sup>106</sup>.

Un estudio corroboró esta propiedad infectando heridas experimentales en cerdos con  $10^8$  UFC de *S. aureus* y *Streptococcus epidermidis*. Las heridas tratadas con VAC tuvieron una disminución en el recuento de bacterias a un valor de  $10^3$  tras 5 días. En cambio, a este tiempo, el grupo

control sin tratamiento mostró niveles máximos de bacterias cercanos a  $10^9$  microorganismos/gramo<sup>144</sup>.

Además, la mejora de la oxigenación local aumenta la respuesta inmune en la zona y dificulta la infección por bacterias anaerobias<sup>106</sup>.

Sustancia o material	Ventajas	Inconvenientes	Fase de la cicatrización y tipo de heridas recomendadas
<b>Tratamientos biológicos</b>			
<b>Terapias celulares</b>	Mejoran el proceso de cicatrización. Las MSCs y el PRP actúan sobre el sistema inmune. Combinan los péptidos antimicrobianos con otras vías de actuación.	Requiere un procesado y preparación del producto para cada individuo.	Indicado en la fase temprana de proliferación, en heridas sin tejido necrótico ni mucha contaminación.
<b>Miel</b>	Capaz de eliminar bacterias resistentes.	Coste del tratamiento elevado	Indicado en la fase inflamatoria o el principio de la fase de formación de tejido de granulación.
<b>Aceites esenciales</b>	Amplio espectro de actividad antimicrobiana. A dosis bajas reducen la virulencia de algunos microorganismos. El aceite del árbol del te además posee propiedades antiinflamatorias y de fibroplasia.	Se requieren más estudios <i>in vivo</i> de estos compuestos. Su disponibilidad en el mercado para poder aplicarse en heridas es limitada.	Indicados en las fases inflamatoria y de formación de tejido de granulación.
<b>Tratamientos físico-químicos</b>			
<b>Polihexanida</b>	Efecto postantiséptico sostenido. Mantiene su capacidad bactericida en presencia de materia orgánica. No induce resistencia en bacterias.	Hipersensibilidad en algunos individuos.	Indicado para limpiar heridas contaminadas o para aplicarla sobre heridas en la fase inflamatoria.
<b>Plata</b>	Baja toxicidad para las células epiteliales. Eficaz para la eliminación de todo tipo de bacterias.	Existen resistencias documentadas a este compuesto.	Indicado en heridas quirúrgicas y/o contaminadas.
<b>Ácido bórico</b>	Inhibición del crecimiento de multitud de bacterias. Inhibe la formación de <i>biofilms</i> . Favorece la cicatrización.	Presenta citotoxicidad a altas dosis.	Indicado para heridas con pérdida de tejido y contaminadas.
<b>Ozono</b>	Acción antibacteriana y antimicótica directa. Activa la expresión de varios genes proinflamatorios. Estimula el sistema inmunitario. Estimula la cicatrización.	Elevada citotoxicidad y estrés oxidativo en las células epiteliales a dosis altas o prolongadas en el tiempo.	Recomendado para ozonificar soluciones de lavado o aceites vegetales para su posterior aplicación en todo tipo de heridas.
<b>Presión negativa</b>	Incrementa el flujo sanguíneo local, estimula la actividad mitótica. Además, se retira exudado de la herida. Mejora la oxigenación local y estimula el sistema inmune.	Puede desecar el lecho de la herida tras varias aplicaciones y requiere la combinación posterior con apósitos.	Utilizar únicamente en heridas con mucho exudado y que no presenten tejido necrótico.

Tabla 2. Resumen de los tratamientos antimicrobianos más comunes resaltando las ventajas, inconvenientes e indicaciones de cada uno.

## 6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

- 1) El uso de antibióticos tópicos y sistémicos en heridas abiertas solo es efectivo cuando se cumplen las siguientes condiciones: signos de infección (local y/o sistémica), ausencia de tejido de granulación y de biofilms. Una inadecuada racionalización del uso de la antibioterapia puede interferir en el proceso de cicatrización, y propiciar la aparición de resistencias microbianas.
- 2) Las resistencias bacterianas son uno de los mayores retos que afronta la sanidad global (humana y animal). Se han descrito mecanismos de resistencia en bacterias asociadas a infecciones en la piel que afectan a la especie equina. Estos mecanismos son muy diversos y de rápida difusión y propician la aparición de cepas multirresistentes.
- 3) La aparición de resistencias ha incrementado el interés por el estudio científico de tratamientos alternativos. Aunque muchas de estas opciones presentan resultados prometedores, todavía es

necesario profundizar en su capacidad antimicrobiana *in vivo* para extrapolar su uso a la clínica equina.

**Conclusión final:** La cicatrización es un proceso complejo y dinámico, que por tanto requiere que en cada fase se aplique un tratamiento específico dependiendo de su evolución y no puede limitarse a la mera administración de antibióticos. De hecho, el uso indiscriminado de antibióticos favorece la creación de cepas resistentes que suponen un problema para la Sanidad global. De este problema a gran escala, surge la imperante necesidad de buscar sustancias antimicrobianas alternativas que reduzcan la administración de antibióticos.

- 1) The use of topical and systemic antibiotics in open wounds is only effective when signs of infection are present and granulation tissue and biofilm are absent. Inadequately rationalizing antibiotherapy use may interfere with the healing process and lead to the emergence of microbial resistances.
  - 2) Bacterial resistances are one of the greatest challenges that global health faces today. Resistance mechanisms have been described in bacteria associated with skin infections affecting the equine species. These mechanisms are very diverse and rapidly spreading, thus favouring the appearance of multi-resistant strains.
  - 3) The rising of resistances has promoted the interest in scientifically studying alternative treatments. Although many of these options show promising results, it is necessary to gain further knowledge in its antimicrobial capacity *in vivo* to extrapolate its use to the equine clinic.
- Final conclusion:** wound healing is a complex and dynamic process, requiring a specific treatment for each stage that cannot be limited to just administering antibiotics. In fact, massive use of antibiotics favours the creation of resistant strains that are a problem for global health. This great scale problem urgently requires to seek for alternative antimicrobial substances to reduce the administration of antibiotics.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo me ha permitido profundizar en un tema que ha despertado mi curiosidad desde que atendí en el año 2017 a las charlas de la veterinaria Jacintha Wilmink, las cuales trataban sobre el manejo terapéutico de heridas en caballos, que tuvieron lugar en el Congreso de Medicina y Cirugía Equina que se celebra cada año en Sevilla.

Este Trabajo de Fin de Grado me ha otorgado la oportunidad de comprender la gravedad de la situación que se afronta actualmente en el ámbito médico y veterinario en general y en las heridas en particular, con respecto a las resistencias antimicrobianas. De igual manera, la lectura de los múltiples artículos me ha permitido tener una amplia visión sobre los distintos

tratamientos que existen para la atención de una herida abierta con el objetivo de reducir, en la medida de lo posible, la aplicación de antibióticos. Por otro lado, me ha servido para formarme en la realización de revisiones bibliográficas de rigor científico. Por último, agradecer a mis tutores, Antonio Romero Lasheras y Laura Barrachina Porcar, sus consejos y opiniones a lo largo de la elaboración de esta revisión. Y también darle las gracias a mis amigos cercanos, y en especial a mi pareja, por la inestimable ayuda y apoyo prestados desde el principio.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Jones HW. Report of a Series of Cases of Syphilis Treated by Ehrlich's Arsenobenzol at the Walter Reed General Hospital, District of Columbia. *Bost Med Surg J.* 1911;164:381–3.
2. Schwartz RS. Paul Ehrlich's Magic Bullets. *N Engl J Med.* 2004;350:1079–80.
3. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, et al. Penicillin As a Chemotherapeutic Agent. *Lancet.* 1940;1172:226–8.
4. Smith DR, Gaunt PS, Plummer PJ, Cervantes HM, Davies P, Fajt VR, et al. The AVMA's definitions of antimicrobial uses for prevention, control, and treatment of disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2019;254:792–7.
5. Prescott JF. History and Current Use of Antimicrobial Drugs in Veterinary Medicine. *Microbiol Spectr.* 2017;5:1–15.
6. Upadhyay A, Karumathil DP, Upadhyaya I, Bhattaram V, Venkitanarayanan K. Controlling bacterial antibiotic resistance using plant-derived antimicrobials. In: Kon K, Rai M, editors. *Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches.* 1st ed. Chennai, India: Academic Press of Elsevier; 2016. p. 205–15.
7. Giguère S. Antimicrobial Drug Action and Interaction: An Introduction. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* 5th ed. 2013. p. 11–25.
8. Loeffler A. Multi-resistant infections: Current knowledge and strategies. In: *Proceeding of the European College of Veterinary Surgeons Annual Scientific Meeting.* Rome, Italy; 2013. p. 59–60.
9. Comisión Europea. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo relativa al Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas. *D Of la Unión Eur Ser C.* 2011;1–17.
10. Consejo de la Unión Europea. Conclusiones del Consejo, de 22 de junio de 2012, sobre la repercusión de la resistencia a los agentes antimicrobianos en el sector de la salud humana y en el sector veterinario — Una perspectiva de «Salud Única». *D Of la Unión Eur Ser C.* 2012;4–8.
11. United States Department of Agriculture. *Equine* 2015. 2016;
12. Ross SE, Duz M, Rendle DI. Antimicrobial selection and dosing in the treatment of wounds in the United Kingdom. *Equine Vet J.* 2016;48:676–80.
13. Theoret C. Physiology of Wound Healing. In: Theoret C, Schumacher J, editors. *Equine wound management/* edited by Christine Theoret, Jim Schumacher. 3rd ed. Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2017. p. 96.
14. Wilmink JM, Weeren V, Rene P. Second-Intention Repair in the Horse and Pony and Management of Exuberant Granulation Tissue. 2005;21:15–32.

15. Jacobs K, Leach D, Fretza P, Al E. Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet Surg.* 1984;13:83–90.
16. Knottenbelt D. Equine wound management: are there significant differences in healing at different sites on the body? *Vet Dermatol.* 1997;8:273–90.
17. Hughes LA, Pinchbeck G, Callaby R, Dawson S, Clegg P, Williams N. Antimicrobial prescribing practice in UK equine veterinary practice. *Equine Vet J.* 2013;45:141–7.
18. Anderson J. Approaches to equine wound management : basic principles [Internet]. *Vet Times.* 2016. p. 1–22. Available from: <https://www.vettimes.co.uk/article/approaches-to-equine-wound-management-basic-principles/?format=pdf>.
19. Wilmink J. Differences in Wound Healing between Horses. In: Theoret C, Schumacher J, editors. *Equine wound management/* edited by Christine Theoret, Jim Schumacher. 3rd ed. Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2017. p. 14–27.
20. Thomas S. Wounds and wound healing in: *Wound management dressings.* Iowa, USA; 1990. p. 1–14.
21. Elce Y. Approaches to wound closure. In: Theoret C, Schumacher J, editors. *Equine wound management/* edited by Christine Theoret, Jim Schumacher. 3rd ed. Iowa, USA; 2017. p. 157–72.
22. Celeste C. Selection of suture materials, suture patterns and drains for wound closure. In: Theoret C, Schumacher J, editors. *Equine wound management/* edited by Christine Theoret, Jim Schumacher. 3rd ed. Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2017. p. 173–199.
23. Kamus L, Theoret C. Choosing the Best Approach to Wound Management and Closure. *Vet Clin NA Equine Pract.* 2018;34:499–509.
24. Wilmink J, Stolk P, Van Weere P. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J.* 1999;31:53–60.
25. Monteiro S, Lepage O, Theoret C. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res.* 2009;70:277–82.
26. Schumacher J, Stashak T. Management of wounds of the distal extremities. In: Theoret C, Schumacher J, editors. *Equine wound management/* edited by Christine Theoret, Jim Schumacher. 3rd ed. Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2017. p. 312–351.
27. Dart A, Sole-Guitart A, S.Stashak T, Theoret C. Selected Factors that Negatively Impact Healing. In: *Equine wound management/* edited by Christine Theoret, Jim Schumacher. 3rd ed. 2017. p. 30–44.
28. Gaschen L. Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference. In: *North American Veterinary Conference.* 2007. p. 568–70.
29. Wilmink J. The value of veterinary wound management for human wounds and wound care. In: *Symposium on Veterinary Wound Management and Antimicrobial Resistance: Animal Wound Care - Best practice and new knowl- edge) at the EWMA.* 2014. p. 39–41.
30. Lepault E, Celeste C, Dore M, Martineau D, Theoret CL. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen.* 2005;13:520–9.
31. Cochrane C, Pain R, Knottenbelt D. In-vitro wound contraction in the horse: differences between body and limb wounds. *Wounds.* 2003;15:175–81.
32. Gottrup F, Apelqvist J, Bjansholt T, Cooper R, Moore Z, Peters E, et al. Antimicrobials and Non-healing Wounds Evidence, controversies and suggestions. *J Wound Care.* 2013;22 Suppl:S1–92.

33. Carrel A. Cicatrization of wounds : XII. Factors Initiating Regeneration. *J Exp Med.* 1921;34:425–34.
34. Raju D, Jindrak K, Weiner M, Enquist I. A study of the critical bacterial inoculum to cause a stimulus to wound healing. *Surg Gynecol Obstet.* 1977;144:347–50.
35. Raahave D. The Infective Dose of Aerobic and Anaerobic Bacteria in Postoperative Wound Sepsis. *Arch Surg.* 1986;121:924.
36. Bowler P. The 105 bacterial growth guideline: Reassessing its clinical relevance in wound healing. *Ostomy Wound Manage.* 2003;49:44–53.
37. Trengove N, MC S, McGeachie D, Mata S. Qualitative bacteriology and leg ulcer healing. *J Wound Care.* 1996;5:277–80.
38. Davies CE, Hill KE, Newcombe RG, Stephens P, Wilson MJ, Harding KG, et al. A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs. *Wound Repair Regen.* 2007;15:17–22.
39. Ralls MW, Demehri FR, Feng Y, Woods Ignatoski KM, Teitelbaum DH. Enteral nutrient deprivation in patients leads to a loss of intestinal epithelial barrier function. *Surgery.* 2015;157:732–42.
40. Krezalek MA, Alverdy JC. The influence of intestinal microbiome on wound healing and infection. *Semin Colon Rectal Surg.* 2018;29:17–20.
41. Babrowski T, Holbrook C, Moss J, Gottlieb L, Valuckaite V, Zaborin A, et al. Pseudomonas aeruginosa Virulence Expression Is Directly Activated by Morphine and Is Capable of Causing Lethal Gut-Derived Sepsis in Mice During Chronic Morphine Administration. *Ann Surg.* 2012;255:386–93.
42. Zaborin A, Romanowski K, Gerdes S, Holbrook C, Lepine F, Long J, et al. Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:6327–32.
43. Krezalek MA, Hyoju S, Zaborin A, Okafor E, Chandrasekar L, Bindokas V, et al. Can Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Silently Travel From the Gut to the Wound and Cause Postoperative Infection? Modeling the “Trojan Horse Hypothesis.” *Ann Surg.* 2018;267:749–58.
44. Poutahidis T, Kearney SM, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, et al. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One.* 2013;8.
45. Levesque CL, Turner J, Li J, Wizzard P, St Pierre B, Lim D, et al. In a Neonatal Piglet Model of Intestinal Failure, Administration of Antibiotics and Lack of Enteral Nutrition Have a Greater Impact on Intestinal Microflora Than Surgical Resection Alone. *J Parenter Enter Nutr.* 2017;41:938–45.
46. Costa MC, Stämpfli HR, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Gomes RG, Weese JS. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC Vet Res.* 2015;11:1–12.
47. Zhang M, Jiang Z, Li D, Jiang D, Wu Y, Ren H, et al. Oral Antibiotic Treatment Induces Skin Microbiota Dysbiosis and Influences Wound Healing. *Microb Ecol.* 2014;69:415–21.
48. Martin CR, Edstrom EL, Krizek JT, Groskin GM. The Efficacy of Systemic Antibiotics in the Treatment of Granulating Wounds. *J Surg Res.* 1974;16:299–306.
49. Edwards-Milewski ML, Morello SL, Zhao Q, Mattan-Bell C. The Effect of Intravenous Regional Perfusion of the Distal Limb With Amikacin Sulfate on Wounds Healing by Second Intention in Horses. *Vet Surg.* 2016;45:125–32.
50. Spohr A, Schjøth B, Wiinberg B, Houser G, Willesen J, Jessen LR, et al. Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice. 2012. 99 p.

51. Hanson RR. Medical Therapy in Equine Wound Management. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2018;34:591–603.
52. Lipsky BA, Dryden M, Gottrup F, Nathwani D, Seaton RA, Stryja J. Antimicrobial stewardship in wound care: A position paper from the british society for antimicrobial chemotherapy and European wound management association. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:3026–35.
53. Lipsky BA, Hoey C. Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1541–9.
54. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017;34:599–610.
55. Lineaweaver W. Topical Antimicrobial Toxicity. *Arch Surg.* 1985;120:267.
56. Draelos ZD, Rizer RL, Trookman NS. A comparison of postprocedural wound care treatments: Do antibiotic-based ointments improve outcomes? *J Am Acad Dermatol.* 2011;64:S23–9.
57. Bischofberger A, Tsang A, Horadagoda N, Dart C, Perkins N, Jeffcott L, et al. Effect of activated protein C in second intention healing of equine distal limb wounds: a preliminary study. *Aust Vet J.* 2015;93:361–6.
58. Gillespie Harmon CC, Hawkins JF, Jianming L, Connell S, Miller M, Saenger M, et al. Full-Thickness Equine Skin Wounds. 2017;78:638–46.
59. Hariharan H, Barnum DA, Mitchell WR. Drug resistance among pathogenic bacteria from animals in Ontario. *Can J Comp Med.* 1974;38:213–21.
60. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ.* 1998;317:657–60.
61. Afset JE, Maeland JA. Susceptibility of skin and soft-tissue isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* to topical antibiotics: indications of clonal spread of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scand J Infect Dis.* 2003;35:84–9.
62. Vivoni AM, Santos KRN, De-Oliveira MP, Giambiagi-deMarval M, Ferreira ALP, Riley LW, et al. Mupirocin for Controlling Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Lessons From a Decade of Use at a University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26:662–7.
63. Fridkin S, Baggs J, Fagan R, Magill S, Pollack LA, Malpiedi P, et al. Vital signs: improving antibiotic use among hospitalized patients. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014;63:194–200.
64. Schwechler J, van den Hoven R, Schoster A. Antimicrobial prescribing practices by Swiss, German and Austrian equine practitioners. *Vet Rec.* 2016;178:216.1-216.
65. Ungemach FR, Müller-Bahrtdt D, Abraham G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:33–8.
66. De Briyne N, Atkinson J, Pokludová L, Borriello SP, Price S. Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe. *Vet Rec.* 2013;173:475.
67. Orsini JA. Update on Managing Serious Wound Infections in Horses: Wounds Involving Soft Tissues. *J Equine Vet Sci.* 2017;55:18–26.
68. Öien RF, Forssell HW. Ulcer healing time and antibiotic treatment before and after the introduction of the Registry of Ulcer Treatment: an improvement project in a national quality registry in Sweden. *BMJ Open.* 2013;3:e003091.
69. Weese JS, Archambault M, Dick H, Hearn P, Kreiswirth BN, Said-Salim B, et al. Methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* in Horses and Horse Personnel, 2000–2002. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:430–5.
70. Burton S, Reid-Smith R, McClure JT, Weese JS. *Staphylococcus aureus* colonization in healthy horses in Atlantic Canada. *Can Vet J.* 2008;49:797–9.
  71. Theelen MJP, Wilson WD, Edman JM, Magdesian KG, Kass PH. Temporal trends in in vitro antimicrobial susceptibility patterns of bacteria isolated from foals with sepsis: 1979–2010. *Equine Vet J.* 2014;46:161–8.
  72. Orsini JA, Elce YA, Kraus B. Management of Severely Infected Wounds. In: *Equine Wound Management.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 449–75.
  73. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 1992;257:1064–73.
  74. Tenover FC. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med.* 2006;119:S3–10.
  75. Lam AK, Hill MA, Moen EL, Pusavat J, Wouters CL, Rice C V. Cationic Branched Polyethylenimine (BPEI) Disables Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *ChemMedChem.* 2018;13:2240–8.
  76. Seke Etet PF, Nwabo Kamdje NM, Vecchio L, Mahomoodally MF, Farahna M. Signaling Pathways Sustaining Antibiotic Resistance: Lessons From Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches.* 2016. p. 40–50.
  77. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* : Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45:568–85.
  78. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. In: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition.* American Society of Microbiology; 2016. p. 481–511.
  79. Matter D, Rossano A, Limat S, Vorletfawer L, Brodard I, Perreten V. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitonisillarum*. *Vet Microbiol.* 2007;122:146–56.
  80. Roupas A, Pitton JS. R factor-mediated and chromosomal resistance to ampicillin in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974;5:186–91.
  81. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 1995;15:593–600.
  82. Maddox TW, Clegg PD, Williams NJ, Pinchbeck GL. Antimicrobial resistance in bacteria from horses: Epidemiology of antimicrobial resistance. *Equine Vet J.* 2015;47:756–65.
  83. Nolff MC, Reese S, Fehr M, Dening R, Meyer-Lindenberg A. Assessment of wound bio-burden and prevalence of multi-drug resistant bacteria during open wound management. *J Small Anim Pract.* 2016;57:255–9.
  84. Leaper D, Assadian O, Edmiston CE. Approach to chronic wound infections. *Br J Dermatol.* 2015;173:351–8.
  85. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284:1318–22.
  86. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Madsen KG, Phipps R, Kroghfelt K, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen.* 2008;16:2–10.
  87. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 2012;20:647–57.
  88. Kruse CR, Nuutila K, Lee CCY, Kiwanuka E, Singh M, Caterson EJ, et al. The external microenvironment of

- healing skin wounds. *Wound Repair Regen.* 2015;23:456–64.
89. Schierle CF, De La Garza M, Mustoe TA, Galiano RD. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen.* 2009;17:354–9.
  90. Westgate SJ, Percival SL, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA. Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms. *Vet Microbiol.* 2011;150:152–9.
  91. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley a. P. Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Infect Immun.* 2002;70:6339–45.
  92. Freeman K, Woods E, Welsby S, Percival SL, Cochrane CA. Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Can J Microbiol.* 2009;55:197–202.
  93. Scalise A, Bianchi A, Tartaglione C, Bolletta E, Pierangeli M, Torresetti M, et al. Microenvironment and microbiology of skin wounds: The role of bacterial biofilms and related factors. *Semin Vasc Surg.* 2015;28:151–9.
  94. Edmiston CE, Goheen MP, Seabrook GR, Johnson CP, Lewis BD, Brown KR, et al. Impact of selective antimicrobial agents on staphylococcal adherence to biomedical devices. *Am J Surg.* 2006;192:344–54.
  95. Frei E, Hodgkiss-Harlow K, Rossi PJ, Edmiston CE, Bandyk DF. Microbial Pathogenesis of Bacterial Biofilms. *Vasc Endovascular Surg.* 2011;45:688–96.
  96. Edmiston CE, Krepel CJ, Leaper D, Ledebouer NA, Mackey T-L, Graham MB, et al. Antimicrobial Activity of Ceftaroline and Other Anti-Infective Agents against Microbial Pathogens Recovered from the Surgical Intensive Care Patient Population: A Prevalence Analysis. *Surg Infect (Larchmt).* 2014;15:745–51.
  97. Davis SC, Martinez L, Kirsner R. The diabetic foot: the importance of biofilms and wound bed preparation. *Curr Diab Rep.* 2006;6:439–45.
  98. Blanco F. Cura en ambiente húmedo. Cura avanzada. Universidad de León, Facultad de Veterinaria; 2019.
  99. Blackford JT. Moist Wound Healing- A new concept in wound management. In: North American Veterinary Conference. 2005. p. 106–7.
  100. Textor JA, Clark KC, Walker NJ, Aristizobal FA, Kol A, LeJeune SS, et al. Allogeneic Stem Cells Alter Gene Expression and Improve Healing of Distal Limb Wounds in Horses. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7:98–108.
  101. Harman RM, Yang S, He MK, Van De Walle GR. Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:1–14.
  102. Yeaman MR, Bayer AS. Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist Updat.* 1999;2:116–26.
  103. Li H, Li B. PRP as a New Approach to Prevent Infection: Preparation and *In vitro* Antimicrobial Properties of PRP. *J Vis Exp.* 2013;1–7.
  104. Tang Y-Q, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun.* 2002;70:6524–33.
  105. Majno G. The healing hand: Man and wound in the ancient world. *Am J Phys Anthropol.* 1975;48:257–8.
  106. Brennan AM, Agass R. Equine wound management. In: *Vet Times* [Internet]. 2016. p. 1–14. Available from: <https://www.vettimes.co.uk>
  107. Weston RJ. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chem.* 2000;71:235–9.

108. Molan C. Why honey is effective as a medicine. Its use in modern medicine. *Bee World*. 1999;80:80.
109. Paul R. learning zone The benefits of honey. *Learn Zo Contin Prof Dev*. 2015;20:57–64.
110. Allen KL, Hutchinson G, Molan PC. The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. 2000;8:1–3.
111. Ait-Ouazzou A, Lorán S, Bakkali M, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J Sci Food Agric*. 2011;91:2643–51.
112. Kennedy DO, Wightman EL. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain function. *Adv Nutr*. 2011;2:32–50.
113. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94:223–53.
114. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*. 1994;269:8022–8.
115. Huerta B, Barrero-Dominguez B, Galan-Relaño A, Tarradas C, Maldonado A, Luque I. Essential Oils in the Control of Infections by *Staphylococcus xylosus* in Horses. *J Equine Vet Sci*. 2016;38:19–23.
116. Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E, Mehrabian A, Feily A. Skin Wound Healing and Phytomedicine: A Review. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27:303–10.
117. Messenger S, Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effectiveness of hand-cleansing formulations containing tea tree oil assessed ex vivo on human skin and in vivo with volunteers using European standard EN 1499. *J Hosp Infect*. 2005;59:220–8.
118. Sanchez IR, Swaim SF, Nusbaum KE, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Vet Surg*. 1988;17:291–5.
119. Bhardwaj P, Ziegler E, Palmer KL. Chlorhexidine Induces VanA-Type Vancomycin Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:2209–21.
120. Beier RC, Foley SL, Davidson MK, White DG, McDermott PF, Bodeis-Jones S, et al. Characterization of antibiotic and disinfectant susceptibility profiles among *Pseudomonas aeruginosa* veterinary isolates recovered during 1994-2003. *J Appl Microbiol*. 2015;118:326–42.
121. Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *Int Wound J*. 2013;10:9–14.
122. Kramer A, Dissemond J, Kim S, Willy C, Mayer D, Papke R, et al. Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31:28–58.
123. Kaehn K. Polihexanide: A Safe and Highly Effective Biocide. *Skin Pharmacol Physiol*. 2010;23:7–16.
124. Müller G, Koburger T, Kramer A. Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsion and consequences for microbicidal efficacy and cytotoxicity. *Chem Biol Interact*. 2013;201:58–64.
125. Kramer A, Roth B, Müller G, Rudolph P, Klöcker N. Influence of the Antiseptic Agents Polyhexanide and Octenidine on FL Cells and on Healing of Experimental Superficial Aseptic Wounds in Piglets. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004;17:141–6.
126. Nolff MC, Winter S, Reese S, Meyer-Lindenberg A. Comparison of polyhexanide, cold atmospheric plasma and saline in the treatment of canine bite wounds. *Journal of Small Animal Practice*. 2018;1–8.

127. Gordon O, Vig Slenters T, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, et al. Silver Coordination Polymers for Prevention of Implant Infection: Thiol Interaction, Impact on Respiratory Chain Enzymes, and Hydroxyl Radical Induction. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4208–18.
128. Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Hase CC. Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2668–70.
129. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* 2000;3:3–8.
130. Bhattacharyya M, Bradley H. A Case Report of the Use of Nanocrystalline Silver Dressing in the Management of Acute Surgical Site Wound Infected With MRSA to Prevent Cutaneous Necrosis Following Revision Surgery. *Int J Low Extrem Wounds.* 2008;7:45–8.
131. Loh J V, Percival SL, Woods EJ, Williams NJ. Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. 2009;6:32–8.
132. Uçan US, Sayin Z. Proliferation effects of phenylboronic acid and boric acid on canine peripheral blood mononuclear cells. *Turkish J Vet Anim Sci.* 2019;43:229–34.
133. Sayin Z, Ucan US, Sakmanoglu A. Antibacterial and Antibiofilm Effects of Boron on Different Bacteria. *Biol Trace Elem Res.* 2016;173:241–6.
134. Nzietchueng RM, Dousset B, Franck P, Benderdour M, Nabet P, Hess K. Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *J Trace Elem Med Biol.* 2002;16:239–44.
135. Tepedelen BE, Soya E, Korkmaz M. Boric Acid Reduces the Formation of DNA Double Strand Breaks and Accelerates Wound Healing Process. *Biol Trace Elem Res.* 2016;174:309–18.
136. Borges GÁ, Elias ST, da Silva SMM, Magalhães PO, Macedo SB, Ribeiro APD, et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2017;45:364–70.
137. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. *Mediators Inflamm.* 2010;1–9.
138. Smith N, Wilson A, Gandhi J, Vatsia S, Khan S. Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res.* 2017;7:212.
139. Jacobsen S. Topical Wound Treatments and Wound-Care Products. In: *Equine wound management/* edited by Christine Theoret, Jim Schumacher. 2017. p. 76–99.
140. Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol.* 2005;153:1096–100.
141. Lambert KV, Hayes P, McCarthy M. Vacuum Assisted Closure: A Review of Development and Current Applications. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29:219–26.
142. Venturi ML, Attinger CE, Mesbahi AN, Hess CL, Graw KS. Mechanisms and Clinical Applications of the Vacuum-Assisted Closure (VAC) Device. *Am J Clin Dermatol.* 2005;6:185–94.
143. Goldsworthy S, McAlinden A. Use of Vac in wound management. *Vet Times.* 2011;18–21.
144. Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg.* 1997;38:553–62.
145. Jacobsen S. Update on Wound Dressings: Indications and Best Use. In: *Equine wound management/* edited by Christine Theoret, Jim Schumacher. 3rd ed. 2017. p. 104–27.