



Universidad Científica del Sur

Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE CICATRIZACIÓN EN HERIDAS
QUIRÚRGICAS CUTÁNEAS ABDOMINALES TRAS LA APLICACIÓN
DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN UN MODELO ANIMAL”

Tesis para optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

CARLOS ANTONIO BENITES RAMIREZ
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LIMA, PERÚ

2019

Acta de Sustentación de Tesis

Siendo las 17:00 horas del 06 de febrero de 2019, en el Auditorio – Campus Villa I, bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 075-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2018**, presidido por el M.V. Juan Alberto Vargas Zúñiga, M.V. Z. Ricardo Timmermann Flores, Dr. Natán Vega Rodríguez y el M.V. Eben Salinas Campos como Director – Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis **“EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE CICATRIZACIÓN EN HERIDAS QUIRÚRGICAS CUTÁNEAS ABDOMINALES TRAS LA APLICACIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN UN MODELO ANIMAL”**.

El presidente concedió el uso de la palabra al Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Benites Ramírez Carlos Antonio**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, el bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.

El Jurado acordó otorgarle la nota de:

Diecisiete (17)

El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las 18:00hrs.

.....
M.V. Juan Alberto Vargas Zúñiga
Presidente

.....
M.V. Z. Ricardo Timmermann Flores
Miembro

.....
Dr. Natán Vega Rodríguez
Miembro

.....
M.V. Eben Salinas Campos
Director - Observador

001-2019

Teléfono: 02982-440000
Fax: 02982-440002
www.cientifica.edu.pe

Campus
Puntarenas Sur
Av. 28 - 1414-12

DEDICATORIA

A mi papá, Juan Carlos Benites Azabache, por ser la persona más inspiradora que he conocido, la que más admiro, por presionarme para que cumpla mis metas, por creer ciegamente en mí y enseñarme que la perseverancia es la clave del éxito. Siempre estaré agradecido y orgulloso de ser su hijo.

A mi mamá, Etelvina Marion Ramirez Pajuelo, por ser amorosa, siempre preocuparse por mí y mi hermano, por apoyarme en todo y ser la persona más comprensiva, así como bondadosa, me da felicidad saber que soy más parecido a ella de lo que cree.

A mis abuelitas, Rosa y Ethel, quienes me enseñaron el amor por los animales, por cuidarlos y criarlos, por ser las personas más influyentes en mi vida. Su amor siempre va a acompañar cada uno de mis días. Ellas son el ejemplo de lucha más grande que tengo, no hay nadie que pueda compararse con ellas, cada una, en sus realidades, sacó a sus familias adelante. Tengo el privilegio de ser nieto de ambas.

A mi hermano, Rodrigo, por ser mi compañero y el que sigue mis pasos, es uno de mis más grandes orgullos verlo crecer día a día. Siempre estaré apoyándolo hasta que mi vida se acabe. Mi hermano será siempre el primer más grande regalo que me dieron mis padres.

Para C, E, N y A, quienes fueron, son y serán parte de mi vida y las recordaré con todo mi corazón. Nunca me alcanzarán las palabras para decir lo feliz que me hicieron y que mi vida no sería lo mismo si es que no hubieran participado en ella.

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Eben Salinas, por enseñarme la pasión por el quirófano, tanto para la anestesia como para la cirugía y por dejarme aprender las bases de la traumatología.

A la profesora, Rosario Ramírez, por tener paciencia y disposición para guiarme durante la parte práctica.

Al profesor, Ermanno Manniero, por ser un guía, un maestro, una persona a la que siempre podía acudir por un consejo, el docente que más admiro y respeto en mi casa de estudios y una de las mejores personas que he tenido el placer de conocer en mi vida.

Al profesor, Ruben Eglinton Villacalqui, por sus consejos que fueron claves para concretar la tesis.

A Elizabeth Lizeth Villar Sáenz por su ayuda en la realización de este trabajo, por todo el cariño, la paciencia, el cuidado y la comprensión con mi persona. Más que una amiga, es una compañera que me ayudo a salir adelante en una parte importante de mi vida.

A mi tía, Hayde Ramirez, por ser una segunda mamá y estar siempre para nosotros en todo momento.

A Diego Linares, Diego Arce, Fabiola Iturriaga y Bruno Abad por ser mis grandes amigos y asistirme en la parte piloto y práctica de este proyecto, haciendo más fácil su realización.

A Daniel Mamanni y Nelly Koga por facilitarme las instalaciones para realizar las pruebas piloto de la parte práctica de la tesis.

A todos mis amigos, los que me acompañaron en la etapa universitaria y fuera de ella, a cada uno los recuerdo con mucho cariño.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN	12
II. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	13
2.1 ANTECEDENTES	13
2.2 MARCO TEÓRICO	15
2.2.1 GENERALIDADES	15
2.2.2 CICATRIZACIÓN.....	16
2.2.2.1 TIPOS DE CICATRIZACIÓN	16
2.2.2.2 PROCESO DE CICATRIZACIÓN	17
2.2.2.3 PLASMA RICO EN PLAQUETAS	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 LOCALIZACIÓN Y AMBIENTE	31
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	31
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	33
3.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:	33
3.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	33
3.4 PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO.....	33
3.5 MATERIALES Y EQUIPOS	44
3.6 ANÁLISIS DE DATOS.....	45
IV. RESULTADOS	46
V. DISCUSIÓN	60
VI. CONCLUSIONES	65
VII. RECOMENDACIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	72

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Conejo siendo preparado 35

Imagen 2. Extracción de sangre, centrifugación, separación del plasma rico en plaquetas y plasma activado con gluconato de calcio..... 356

Imagen 3. Conejo siendo sedado para un mejor manejo y preparación. 37

Imagen 4. Marcaje de los espacios entre cada punto, aplicación del PRP y sutura de los espacios marcados..... 38

Imagen 5. Toma de muestra con sacabocados.....39

Imagen 6. Muestras envasadas para ser llevadas al laboratorio y ser procesadas para su evaluación histológica..... 40

Imagen 7. Segmento evaluado de la herida quirúrgica con presencia de edema leve, color rosado concorde al de la piel, sin presencia de exudado y mala aposición de los bordes de la herida..... 41

Imagen 8. Segmento evaluado de la herida quirúrgica con moderada presencia de edema, color rojizo intenso, leve presencia de exudado y mala aposición de los bordes de la herida 41

Imagen 9. (a y d) Polimorfonuclear (Neutrofilo), (b y c) Monocito, (e) linfocito..... 42

Imagen 10. (a, b, c) Vasos sanguíneos neoformados (d, e, f), fibroblastos (g) y fibras de colágeno 42

Imagen 11. (a, b, d, e). Polimorfonucleares, (c) fibras de colágeno organizándose, (f) vasos sanguíneos neoformados, (g,h,i) fibroblastos, (j) linfocito y (k) macrófago. 43

Imagen 12. a. colágeno nuevo y organizado b. vasos sanguíneos formados c. fibroblastos..... 43

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico N 1. Registro de datos del tiempo de la resolución de la herida de los individuos evaluados de manera macroscópica.....	50
Grafico N 2. Registro de datos del tiempo de la resolución de la herida de los individuos evaluados de manera microscópica.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Se muestra la evolución de los grupos evaluados macroscópicamente expresados en porcentaje.	49
Cuadro 2. Se muestra la evolución de los grupos evaluados histológicamente expresados en porcentaje.	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla: Efectos de los factores de crecimiento plaquetario	72
Anexo 2. Ficha 1. Evaluación cualitativa de las características macroscópicas de la herida por día	73
Anexo 3. Ficha 2. Evaluación cuantitativa de las características microscópicas de la herida por grupo (a) y por día de muestreo (b).	74
Anexo 4. Ficha 3	75
Anexo 5. Tabla 3. Evaluación total del estado de recuperación del tejido a nivel macroscópico	77
Anexo 6. Tabla 4. Evaluación total del estado de recuperación del tejido a nivel microscópico	78
Anexo 7.	
Figura 13	79
Anexo 8.	
Figura 14.	81

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el tiempo de cicatrización de heridas quirúrgicas cutáneas abdominales tras la aplicación del plasma rico en plaquetas (PRP), haciendo un seguimiento microscópico y macroscópico. Se usaron conejos adultos machos sanos, de un año de edad, de la raza Nueva Zelanda Blanco ($n = 12$), de 2 kg de peso. Se extrajo 5 ml de sangre de cada conejo para preparar el PRP autólogo, el cual fue activado con gluconato de calcio tras su centrifugación y separación. Las heridas cutáneas se crearon mediante una incisión con bisturí del N.º 3, las cuales fueron hechas a nivel del abdomen, en paralelo y de diez centímetros de largo cada uno. Luego, se trataron mediante una inyección intralesional de PRP en el grupo experimental al que se denominó grupo tratamiento, mientras que el grupo control no recibió ninguna, seguidamente se suturó con puntos discontinuos simples con un espacio de un centímetro entre cada punto. El proceso de curación se evaluó clínica e histológicamente. El registro de datos se hizo mediante fichas, donde se evaluó la presencia de edema, exudado, color y afrontamiento de los bordes como indicadores de curación macroscópica durante los días 1, 3, 6, 10 y 14, mientras que el análisis microscópico se llevó a cabo en los mismos tiempos mediante una biopsia de la herida y su posterior remisión a la unidad de patología de la Universidad Científica del Sur para su análisis, en el que se evaluó la cantidad de polimorfos nucleares, macrófagos, linfocitos, fibroblastos y vasos sanguíneos. Las pruebas estadísticas no demostraron una diferencia significativa entre la cicatrización de los grupos tratamiento y control ($p > 0.05$), no se concluyó que el PRP aplicado al grupo tratamiento haya logrado disminuir el tiempo de cicatrización de la herida quirúrgica cutánea abdominal en los modelos animales.

Palabras clave: incisión, conejos, intralesional, plasma rico en plaquetas, cicatrización.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to evaluate the healing time of abdominal skin surgical wounds after the application of platelet-rich plasma (PRP). Making a microscopic and macroscopic follow-up. Healthy one-year-old adult male rabbits of the New Zealand White breed (n = 12) weighing 2 kg were used. 5 ml of blood was extracted from each rabbit to prepare the autologous PRP which was activated with calcium gluconate after centrifugation and separation. Cutaneous wounds were created by an incision with scalpel of No. 3, which were made at the level of the abdomen in parallel and ten centimeters long each. Then they were treated by an intralesional injection of PRP in the experimental group called the treatment group, while the control group received none, then sutured with simple discontinuous points with a space of one centimeter between each point. The healing process was evaluated clinically and histologically. Data was recorded by means of tokens, where the presence of edema, exudates, color and coping of the edges were evaluated as indicators of macroscopic healing during days 1, 3, 6, 10 and 14 while the microscopic analysis was carried out. Performed at the same times by means of a wound biopsy and its subsequent remission to the pathology unit of the Southern Scientific University for its analysis, in which the amount of nuclear polymorphs, macrophages, lymphocytes, fibroblasts and blood vessels was evaluated. The statistical tests did not show a significant difference between the healing of the treatment and control groups ($p > 0.05$), it was not concluded that the PRP applied to the treatment group has managed to reduce the healing time of the abdominal cutaneous surgical wound in the animal models.

Key words: incision, rabbits, intralesional, platelet-rich plasma, scarring.

I. INTRODUCCIÓN

La cicatrización de la herida quirúrgicas es un proceso dinámico que tarda entre 7 a 10 días hasta el retiro de puntos, siempre que no se presenten complicaciones en la fase posoperatoria, sin embargo, la disminución de este tiempo permitiría una menor estadía hospitalaria, menor uso de fármacos y menos riesgo de infecciones para la mascota (1).

Se han probado diferentes productos para tratar de reducir el tiempo de cicatrización de las heridas, mayormente usados para cicatrización por segunda intención, por lo que su uso en heridas quirúrgicas, por primera intención, no es tan común y son pocos los productos probados con resultados variables y no todos evaluados a nivel tanto macroscópico como microscópico (1,2,3,4).

Es conocida la utilidad del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en la aceleración de la síntesis de heridas cutáneas y maxilofaciales en personas. Ha sido estudiada en diferentes áreas con buenos resultados por lo que su uso es cada vez más común, tanto en medicina humana como en veterinaria. Sin embargo, no muchos de estos estudios hacen un seguimiento detallado de la reparación en cuanto del tiempo de cicatrización, tanto clínico como histológico, y mucho menos evaluaciones sobre este seguimiento en heridas quirúrgicas abdominales, por primera intención, en animales siendo esta la zona de abordaje más común para cirugías (5).

El objetivo de esta investigación será evaluar el tiempo de cicatrización de heridas quirúrgicas abdominales tras la aplicación del plasma rico en plaquetas, haciendo un seguimiento macroscópico y microscópico.

II. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es un concentrado de plaquetas superior a su concentración sanguínea basal. Es muy conocida la utilidad de este en la aceleración de la síntesis de heridas cutáneas y maxilofaciales en personas (5). Ha sido muy estudiado en diferentes áreas con buenos resultados en la aceleración del proceso de cicatrización, recuperaciones más rápidas en lesiones deportivas, reparación de tejido óseo y manejo de procesos osteoartrotríticos por lo que su uso es cada vez más común en medicina humana y veterinaria (6,7).

Las tendencias recientes en la cirugía reconstructiva han demostrado que el uso de PRP (generalmente preparado en forma de gel) viene proporcionando beneficios en este campo. Hasta ahora, pocos estudios bien diseñados están disponibles en una variedad de procedimientos relacionados con ginecología, cardiología y cirugía general (8,9).

De Rossi *et al.* (10) reportaron los beneficios de usar este concentrado autólogo en la recuperación de heridas quirúrgicas en caballos. Demostraron que el PRP acelera hasta cuatro veces la recuperación de la piel. En el examen histológico, las heridas tratadas presentaron una diferenciación epitelial más rápida. Se observó un aumento de la organización del colágeno en la dermis comparado con el grupo control.

Englert *et al.* (11) demostraron que la aplicación de gel de plaquetas (PG) en heridas cardíacas posquirúrgicas promueve la cicatrización de la herida y reduce la incidencia de infecciones posteriores. Su estudio demostró que se pueden reducir los costos de estancia hospitalaria y el tiempo de permanencia en los hospitales. Además, el grupo de tratamiento no tuvo infecciones de heridas incisionales reportadas. Sin embargo, cuatro pacientes (3,16 %) del grupo de control presentaron infecciones en las heridas. Los hallazgos apoyan investigaciones anteriores donde el gel de plaquetas parece influir positivamente en la curación de heridas por incisión entre las personas que se someten a cirugía cardíaca.

De Hingh *et al.* (12) concluyeron que “el pegamento de fibrina rico en plaquetas como pegamento para la colocación de mallas en la corrección de hernias inguinales mejora la tolerancia al material, el dolor posoperatorio, la inflamación y disminuye la cantidad de material de sutura para las mismas” (p 307).

Gómez-Caro *et al.* (13) investigaron si el PRP promovía la curación y reducía las complicaciones anastomóticas después de la cirugía de las vías respiratorias en un modelo animal (cerdo). Se demostró que, tras haberse realizado la anastomosis terminal con una recesión traqueal de más del 50 % hubo un incremento significativo del flujo sanguíneo trans anastomótico. También se encontró que la fuerza para romper la anastomosis en la que se usó PRP tuvo que ser significativamente mayor que el grupo de control. Estos datos evidenciaron que el PRP favorece en un inicio más temprano del proceso de cicatrización.

Abrego *et al.* (14) concluyeron que el PRP disminuye la brecha de lesiones en heridas por quemadura de segundo grado, demostrando su efectividad y la influencia positiva sobre los parámetros de epitelización.

Gómez *et al.* (15) demostraron la utilidad de este en las heridas ocasionadas por la diabetes. Se estudiaron diez pacientes de los cuales solo siete terminaron el proyecto. Se mostró una buena cicatrización de la herida y no se observaron efectos adversos. Los resultados muestran que el gel de PRP autólogo empleado en las úlceras de miembros inferiores logró la regeneración del tejido.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 GENERALIDADES

El procedimiento quirúrgico más común en la práctica del médico veterinario dedicado a especies menores es la incisión y el abordaje de la cavidad abdominal, esto debido a la facilidad de acceso a varios órganos, así como el manejo de la sobrepoblación en hembras a través de las esterilizaciones. La herida inicia el proceso de cicatrización en cuanto el tejido vascularizado es dañado. Este evento genera que se liberen factores procedentes de las plaquetas y células inflamatorias las cuales atraerán a su vez más células, esta acción resultara en la diferenciación a las sucesivas fases del proceso de reparación concluyendo con la restauración del tejido (1,2).

La cicatrización se da en tres fases. La primera fase será la fase inflamatoria en la que se dará una inflamación aguda tras el trauma, esto ocasionará que se liberaren algunos mediadores químicos que atraerán más células a la zona provocando edema, color y rubor. El fin de esta etapa está marcado por el incremento de los fibroblastos en la herida (16, 17).

La segunda fase es la fase proliferativa, esta comienza entre el tercer y cuarto día y se extiende hasta el dieciseisavo. Esta fase se caracteriza porque los fibroblastos empiezan a liberar colágeno y la cantidad de células inflamatorias tiende a disminuir. A los diez días de haber comenzado el proceso de cicatrización, se ha depositado colágeno suficiente como para que brinde una fuerza tensil similar a la de la piel (1, 16, 17).

La tercera fase es la fase de remodelación. Se da cuando la cama de colágeno ya está establecida y la fuerza tensil de la herida es la suficiente para aguantar las influencias del ambiente sobre esta. Se da una reacomodación de las fibras de colágeno en relación con la tensión y orientación de la herida. La cicatriz madurará palideciendo y aplanándose, este proceso tardará meses incluso años hasta que la cicatriz presente una fuerza tensil completa parecida a la de la piel original (1, 16, 17).

2.2.2 CICATRIZACIÓN

La cicatrización es el proceso que se da para reparar los tejidos dañados. Cuando un individuo presenta una lesión se desencadena una serie de eventos fisiológicos que culminarán con la reparación del tejido (2-3, 18, 19). Según Rueda (2) “estos eventos pueden sobreponerse temporalmente entre sí.” Se diferencian en las siguientes fases:

Según Salem et al (20):

Fase inflamatoria:

“Sucede entre el primer y segundo día. Se caracteriza por una respuesta vascular y otra celular, manifestadas por vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y aparición de leucocitos, formándose una costra que sella la herida. Durante este período, el tejido no recupera una fuerza de tensión apreciable y depende únicamente del material de sutura para mantener su posición” (p1).

Fase proliferativa:

“Se da entre el tercer y décimo cuarto día. En este período, aparecen los fibroblastos (células germinales del tejido fibroso) que van a formar el tejido de granulación, compuesto por sustancia fundamental y colágeno. Además, ocurre recanalización de los vasos linfáticos y se forman capilares sanguíneos” (p1).

Fase de remodelación:

“Se extiende entre el décimo quinto día hasta que se logra la cicatrización completa (seis meses a un año). El principal evento fisiológico es la epitelización y el aumento progresivo de la fuerza tensil de la piel (del 70 % al 90 % de la fuerza tensil original). Posteriormente, ocurre la remodelación del colágeno y la regresión endotelial, traducida clínicamente por una disminución del color de la cicatriz” (p 1).

2.2.2.1 TIPOS DE CICATRIZACIÓN

Podemos mencionar tres categorías: el cierre primario o por primera intención, el cierre secundario o por segunda intención y el cierre terciario o también llamado primario diferido.

a. CICATRIZACIÓN POR PRIMERA INTENCIÓN

Los bordes de la herida estarán siempre en contacto estando suturados o no, por lo tanto este proceso de cicatrización requiere de un menor relleno celular y por ende el tiempo de cicatrización será menor. Ejemplos de este tipo de reparación son reposición de laceraciones, colgajos y reanastomosis anatómica de los nervios (1-4).

b. CICATRIZACIÓN POR SEGUNDA INTENCIÓN

Según Barrionuevo (1) y Vadillo (4):

“La cicatrización por segunda intención ocurre cuando los bordes de la herida no han sido correctamente afrontados o cuando se ha producido después de la sutura una dehiscencia de la misma, dejando que se produzca un cierre espontáneo. El tiempo de resolución de la herida es más extenso y genera una cicatriz de mayor tamaño, existiendo un mayor riesgo de infección en la herida. Ejemplos de este tipo de cicatrización son la de heridas por diabetes, quemaduras y lesiones muy abrasivas por trauma” (p 5).

c. CICATRIZACIÓN POR TERCERA INTENCIÓN

Según Vadillo (4):

“Algunos cirujanos utilizan el término de cicatrización por tercera intención, cierre primario diferido o demorado para referirse a la cicatrización que ocurre cuando se cierra una herida después de un período de cicatrización por segunda intención. El cierre se hace cuando se está seguro de que se ha superado el riesgo de infección” (p 19).

“En síntesis, independientemente de la aproximación o no de los bordes, el proceso de reparación es igual, se puede resumir como la formación y maduración del tejido de granulación con migración de los bordes epiteliales. La diferencia radica en que, por primera intención, se acelera el proceso en cuanto al tiempo de curación, al ser menor el espacio entre los márgenes de la herida” (p 19).

2.2.2.2. PROCESO DE CICATRIZACIÓN

Según Ruíz (21):

“Todos los individuos pluricelulares pueden sufrir lesiones de sus tejidos. La reparación tisular constituye un complejo proceso biológico que comprende la integración de diversas fases como la inflamación, la quimiotaxis y división celular, la angiogénesis, la división de proteínas de la matriz extracelular y la remodelación de tejido neo formado. La aparición de un tejido nuevo donde previamente había una solución de continuidad, la formación de un tejido que reproduce las propiedades morfológicas y biomecánicas del tejido previo, la activación de una proliferación masiva de varias estirpes celulares en la región dañada, que el organismo activa y controla localmente una vez restituida la población celular necesaria, son ,en definitiva, datos que explican el interés científico creciente de diversos cambios biomédicos en la reparación tisular” (p36).

a. INFLAMACIÓN

Según Cabrerizo (22):

“No se puede hablar de cronología de una lesión sin establecer previamente los cambios histológicos propios de la inflamación. La inflamación es la reacción defensiva de un tejido vascularizado ante un ataque traumático. Se caracteriza por la aparición de mediadores inflamatorios y el desplazamiento de líquido y células desde la sangre hasta el tejido extravascular. Esta respuesta localiza y elimina células alteradas, partículas extrañas, microorganismos y antígenos, y a su vez pone en marcha los procesos de reparación. La inflamación aguda es la respuesta inicial e inmediata a una lesión, destinada a suministrar leucocitos y proteínas plasmáticas al foco inflamatorio, y se caracteriza por dos fenómenos, uno vascular y otro celular” (p129). Durante la fase inflamatoria, las bacterias y restos celulares serán fagocitados y removidos, así mismo numerosos factores liberados por las plaquetas y polimorfo nucleares causarán la migración y división de las células que están implicadas en la fase proliferativa (2-4, 10, 18, 19).

Cabrerizo (22) también menciona que:

“En un primer momento, se produce una vasoconstricción transitoria y, posteriormente, una vasodilatación de las arteriolas, lo que aumenta el riego sanguíneo en el lecho lesionado. A continuación, tiene lugar un aumento de la permeabilidad de la microvasculatura que produce una alteración de las presiones y la salida de agua e iones a los tejidos extravasculares (edema). Esto favorece el aumento de la concentración de elementos formes en la sangre, que se hace más viscosa y

enlentece su flujo. Todos estos cambios se manifiestan en el microscopio como la visualización de un gran número de pequeños vasos dilatados repletos de eritrocitos en su interior, lo que se conoce como estasis. La estasis, a su vez, favorece el contacto de un gran número de leucocitos, principalmente neutrófilos, con la pared del endotelio vascular, un proceso conocido como marginación. El aumento de la permeabilidad vascular es la principal y más específica característica del inicio de la inflamación y, gracias a ella, se produce la salida de líquido de edema y células inflamatorias. Este es el primer signo histológico de relevancia” (p1288).

“Este aumento de la permeabilidad se produce por la formación de aberturas entre las células endoteliales de las vénulas inducidas por la histamina, la bradicinina, los leucotrienos y otros mediadores químicos (respuesta transitoria inmediata de 15 a 30 minutos de duración). Retracción de células endoteliales por mediación de citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina 1 (IL-1) (comienza entre las 4 y 6 horas del estímulo y se mantiene hasta 24 horas o más). Creación de canales en las células endoteliales formados por vesículas y vacuolas conectadas entre sí. Lesión endotelial directa en vénulas, capilares y arteriolas (respuesta mantenida inmediata, que se inicia inmediatamente tras la lesión y persiste durante varias horas o días” (p128).

b. EL PAPEL DE LAS PLAQUETAS

Según Hernández (23):

“Inicialmente se adhieren las plaquetas al intersticio, donde la trombina y el colágeno fibrilar expuesto las activa, como resultado de esta activación se produce su degranulación, liberando numerosos mediadores: entre ellos fibrinógeno, fibronectina y trombospondina que intervienen en la agregación plaquetaria, el factor VIII, de Von Willebrand que contribuye a la adhesión plaquetaria, actuando como puente de unión entre el colágeno subendotelial y el receptor plaquetario de integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ y el Adenosin difosfato y la trombina que atraen más plaquetas a la zona lesionada. Todo esto da lugar a la agregación plaquetaria y a la formación de un tapón hemostático. Las plaquetas también sintetizan factores de crecimiento: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformador- β (TGF- β) con acción mitógena y quimiotáctica en los fibroblastos, el factor de crecimiento transformador- α (TGF- α) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimulan la epitelización La formación de un coágulo producida por la cascada de coagulación que inician los elementos de la sangre y llevan a la formación de trombina, enzima que transforma el fibrinógeno en fibrina que promueve la coagulación además de activar las plaquetas. El fibrinógeno y los receptores de superficie de las plaquetas se unen y se polimerizan para formar una matriz de fibrina, dando lugar a un trombo. El coágulo de fibrina y la fibronectina proveen una

matriz inicial que favorece la migración de monocitos, fibroblastos y queratinocitos además de intervenir en la respuesta inflamatoria por medio de la bradiquinina y las fracciones C3a y C5a del complemento, los cuales aumentan la permeabilidad vascular y promueven la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos. En forma simultánea el endotelio produce prostaciclina, que inhibe la agregación, lo cual limita el proceso, la antitrombina III, inhibe la formación de fibrina, la proteína C, inhibe al factor VIII y limita la adhesión y el activador del plasminógeno y la plasmina son relevantes en la lisis del coágulo” (p 71-72).

c. VASOCONSTRICCIÓN Y VASODILATACIÓN

Reinke y Sorgh (24) describen:

“Cuando una lesión en la piel se extiende hacia la capa epidérmica, los vasos sanguíneos y linfáticos se traumatizan, haciendo que un flujo de sangre limpie la herida para eliminar los microorganismos y los antígenos. Las diferentes cascadas de coagulación se inician por factores de coagulación de la piel lesionada (sistema extrínseco), y los trombocitos se activan para la agregación por colágeno expuesto (sistema intrínseco). Al mismo tiempo, los vasos lesionados siguen una vasoconstricción de 5 a 10 minutos, desencadenada por las plaquetas, para reducir la pérdida de sangre y llenar el hueco del tejido con un coágulo de sangre compuesto de citoquinas y factores de crecimiento. La vasoconstricción y la formación de coágulos explican un fallo de perfusión local con una falta consecutiva de oxígeno, un aumento de la glucólisis y cambios en el pH. La vasoconstricción es seguida por una vasodilatación en la cual los trombocitos invaden la matriz de la herida provisional. Además, las plaquetas influyen en la infiltración de leucocitos por la liberación de factores quimiotácticos. Tanto las plaquetas como los leucocitos liberan citoquinas y factores de crecimiento para activar el proceso inflamatorio (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α), estimulan la síntesis de colágeno (FGF-2, IGF-1, TGF- β), activan la transformación de los fibroblastos en miofibroblastos (TGF- β), inician la angiogénesis (FGF-2, VEGF-A, HIF-1 α , TGF- β) y apoyar el proceso de reepitelización (EGF, FGF-2, IGF-1, TGF- α). La vasodilatación también puede ser reconocida por un enrojecimiento local (hiperemia) y por un edema de la herida.” (p3).

“Inmediatamente después de que el vaso sanguíneo se rompe, las células liberan factores inflamatorios como tromboxanos y prostaglandinas que hacen que el vaso entre en espasmo para prevenir la pérdida sanguínea y para concentrar células inflamatorias y factores en el área” (p 3).

d. POLIMORFONUCLEARES Y NEUTRÓFILOS

Según Reinke (24):

“Los neutrófilos reclutados en el sitio de la lesión estarán presentes durante 2 a 5 días, sin embargo este tiempo puede alargarse si es que se presente una contaminación e infección de la herida. El trabajo de los neutrófilos es crucial en los primeros días después de la lesión porque su capacidad para la fagocitosis y la secreción de proteasas mata las bacterias locales y ayuda a degradar el tejido necrótico. Además, actúan como quimio atrayentes para otras células que están involucradas en la fase inflamatoria” (p37).

Los polimorfonucleares se presentarán en la herida alrededor de la primera hora de producida la herida. En primera instancia estas serán las células predominantes durante la fase inflamatoria que durará aproximadamente hasta el tercer día, sin embargo otras células como los linfocitos y los macrófagos también estarán presentes eliminando el detritus celular y agentes extraños (1, 2, 24-26).

Los polimorfonucleares serán atraídos por la fibronectina, factores de crecimiento, neuropéptidos y cininas. Usualmente, sufren apoptosis una vez han completado sus tareas y son fagocitados y degradados por los macrófagos (1,2, 24-26).

e. MACRÓFAGOS

Los macrófagos son esenciales para la cicatrización (24-27). Reemplazan a los PMN en la herida tres días después del trauma (24). Son atraídos a la herida por factores de crecimiento liberados por las plaquetas y otras células. Los macrófagos fagocitan las bacterias y el tejido dañado, entran como apoyo para eliminar todos los residuos celulares. Los macrófagos también secretan factores de crecimiento y otras citoquinas, los cuales sirven como mediadores químicos para atraer más macrófagos de ser necesarios y activar la fase proliferativa (24-29).

Los bajos contenidos de oxígeno en el ambiente de la herida estimulan a la producción de factores inductores de la angiogénesis, estos también estimulan la formación del tejido de

granulación y depósito de la matriz extracelular, todo ello resalta la importancia de los macrófagos en el paso de la fase inflamatoria a la fase proliferativa (24-29).

La inflamación es necesaria para prevenir infecciones además de inducir la fase de proliferación por lo que es una parte necesaria de la cicatrización. Según Rueda (2), si esta se extiende más allá de los ocho días, puede provocar daños en el tejido evitando la cicatrización adecuada de la herida, así, reducir la inflamación más no suprimirla es frecuentemente una meta. La inflamación se prolongará hasta que se eliminen los restos celulares y agentes extraños presentes en la herida, si estos no se controlan y perduran se dará una herida crónica (24-32).

f. PROLIFERACIÓN

Se caracteriza por la formación de vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis) a partir de las células endoteliales, depósito de colágeno, actividad fibroblástica, aparición del tejido de granulación y la contracción de la herida. Según Rueda (2) La liberación de colágeno y fibronectina por parte de los fibroblastos forman una nueva matriz extracelular. Alrededor de dos o tres días, luego de que se presenta la herida, los fibroblastos empiezan a ingresar a la herida, incluso antes de que la fase inflamatoria haya terminado completamente teniendo su pico máximo de actividad en la primera semana (25).

g. ANGIOGÉNESIS

Las células endoteliales migran hacia la herida conforma va dándose un aumento en la cantidad de fibroblastos, esto debido a los receptores de superficie presentes en la matriz extracelular (25). La caída de los niveles de oxígeno tisular en la herida generarán un ambiente ácido el cual propiciará el desarrollo endotelial. Los bajos niveles de oxígeno estimularán a los macrófagos y las plaquetas a que produzcan factores angiogénicos que atraigan las células endoteliales mediante la liberación de factores quimio tácticos. Las células endoteliales también serán atraídas por la fibronectina encontrada en la fibrina y por los factores de crecimiento liberados por las plaquetas (25). La angiogénesis es necesaria

para la cicatrización, las células endoteliales nuevas se moverán a través de la matriz celular, esto lo podrán realizar gracias a las prolongaciones que desarrollan llamados pseudópodos. Para ello, necesitan degradar el coágulo y parte de la matriz extracelular, esto lo consiguen con las colagenasas y el activador del plasminógeno (33). Cuando el oxígeno del ambiente aumente, las células dejarán de producir factores angiogénicos por retroalimentación negativa y los vasos sanguíneos que no se requieran sufrirán apoptosis (25, 33,34).

h. FIBROPLASIA Y FORMACIÓN DE TEJIDO DE GRANULACIÓN

Según Reinke y Sorg (24):

“El último paso en la fase de proliferación es el desarrollo del tejido de granulación, al mismo tiempo empieza la fase de remodelación. El tejido de transición, reemplaza la base de fibrina / fibronectina de la matriz de herida y podría producir una cicatriz por maduración. Se caracteriza por una alta densidad de fibroblastos, granulocitos, macrófagos, capilares y colágeno mal organizado como si fueran bultos, debido a esta alta cantidad de compuestos celulares se le llama tejido de granulación. Además, como la angiogénesis aún no está completamente terminada, este tejido es altamente vascular. Como resultado aparece con un enrojecimiento clásico y podría ser traumatizado fácilmente. Sin embargo, la célula dominante en esta fase es el fibroblasto, que cumple diferentes funciones como la producción de colágeno fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y ácido hialurónico. La formación de la matriz extra celular representa otro paso importante ya que proporciona un andamio para la adhesión celular y regula la organización, formación, el crecimiento, movimiento y diferenciación de las células dentro de ella. El fibroblasto es, por lo tanto, el precursor de la matriz de la herida provisional” (p 39).

En los primeros días después del trauma, los fibroblastos proliferan y migran desde los márgenes de la herida, después, se depositan en la matriz colágena de esta. El tejido de granulación, aparece durante la fase inflamatoria, durante la primera semana de ocurrida la herida continúa creciendo hasta que el lecho de la herida esté cubierto (24, 25). Diferentes autores como Reinke y Sorg (24), Delevary et al. (25), Gonzales et al. (35) y Guo & Dipietro (36) coinciden con que los factores de crecimiento y la fibronectina estimulan la proliferación, la migración a la zona de la herida y la producción de factores de crecimiento por parte de los fibroblasto.

Según Guo y Dipietro (36) “La hipoxia contribuye con la proliferación de fibroblastos y la excreción de factores de crecimiento, aunque demasiado poco oxígeno inhibe su crecimiento y el depósito de componentes de la matriz extracelular y puede llevar a la formación de una cicatriz excesiva y fibrótica” (p 220).

i. DEPÓSITO DE COLÁGENO

La producción de colágeno es una de las funciones más importantes de los fibroblastos. Empieza en los primeros días, aun cuando está dándose la fase inflamatoria teniendo su mayor pico de actividad alrededor de la segunda semana (2). La fuerza tensil de la herida es dada por el colágeno. Cuando los fibroblastos producen colágeno, las colagenasas y otros factores lo degradan, inicialmente la producción es mayor que la degradación y, cuando hay un equilibrio, se inicia la fase de maduración (24, 25). Según Guo & Dipietro (36) “La granulación se detiene, los fibroblastos disminuyen y empiezan a sufrir apoptosis, convirtiendo el tejido de granulación de uno rico en células a uno que contiene principalmente colágeno” (p 220).

j. EPITELIZACIÓN

Según Delevary *et al.* (25) “La epitelización es el restablecimiento intacto de la epidermis sobre el tejido recién formado (cicatriz). En la piel intacta, la capa basal de queratinocitos está unida a la lámina basal. Después de la lesión, la organización de los queratinocitos se altera y debe ser restaurado. Este proceso de restauración se inicia dentro de las horas posteriores a la lesión y se realiza mediante queratinocitos que se mueven a través del tejido de granulación. Este proceso de contacto, continúa hasta que se restablecen los queratinocitos de los lados opuestos de la herida” (p 759).

“Antes de la migración, los queratinocitos cambian de forma, se vuelven más planos y alargados, y extienden los procesos celulares que les permitirán desplazarse” (p 759).

Según Ormazabal (39) “La migración de las células epiteliales se da desde los bordes de la herida y esta cesa una vez se encuentran en el punto medio de esta. La migración puede llevarse a cabo incluso desde el momento que se produjo la herida, pero las células epiteliales requieren tejido viable para migrar a través de él. Si la herida es profunda, el organismo producirá tejido de granulación para rellenarla en forma primaria” (p 16).

Tanto Santoro & Gaudino (37), Yang et al. (38) y Ormazabal (39) están de acuerdo en que el inicio de la migración de las células epiteliales es variable pero que el tiempo normal de reemplazo sin daños en la membrana es de tres días, sin embargo, si la membrana basal es lesionada o la herida es muy profunda, la reepitelización ocurrirá desde los bordes de la herida.

Según Kurahashi & Fujii (40) citados por Ormazábal (39), “esta etapa es iniciada con la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF α) quienes estimulan la síntesis y liberación por parte de los fibroblastos del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), óxido nítrico (NO), e IL-6, quienes permiten la proliferación, migración y diferenciación de los queratinocitos a células epidermales” (p 5).

Según Pastar (41), citado por Ormazábal (39) “...la migración de queratinocitos ocurre desde los dos extremos de la herida y termina cuando los queratinocitos de ambos extremos se encuentran en la parte media de la herida; este mecanismo de inhibición de contacto es el que detiene la migración” (p 5).

Según Sonnemann & Bement (42), citados por Ormazábal (39):

“Los fibroblastos son reclutados desde el borde de la herida, estimulados por la secreción del factor de crecimiento de Fibroblastos (FGF), contribuyendo al cierre de la herida por un mecanismo diferente y complementario a la migración de los queratinocitos. Los fibroblastos atraídos a la herida, proliferan y pueden diferenciarse a miofibroblastos, estimulando la migración de queratinocitos desde el borde de la herida y de los apéndices dérmicos como los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y sebáceas. Los fibroblastos y miofibroblastos además contribuyen al cierre de

la herida por secreción en una gran cantidad de colágeno y otros componentes de matriz extracelular (MEC)” (p5).

También Hinz (43) citado por Omazábal (39), describe que “los miofibroblastos contraen la herida, estableciendo una unión con la matriz extracelular situada a los bordes de la herida, reduciendo el tamaño de la herida. Finalmente, los fibroblastos detienen la contracción y hay cambio en la composición de la matriz extracelular dando inicio a la fase de maduración” (p6).

k. CONTRACCIÓN

Alrededor de una semana luego de producida la herida, los fibroblastos se han diferenciado en miofibroblastos, así mismo la herida se empieza el proceso de contracción. La contracción se presenta entre los 5 a 15 días de producida la herida y puede durar varias semanas, incluso puede continuar aun cuando la herida ya concluyo con la reepitelización. (22).

Según Ruiz (21):

“La retracción de las fibras colágenas tiene un papel secundario en la reducción del espacio lesionado. Los fibroblastos tienen una actividad más decisiva en la contracción, ya que en ciertos tejidos una vez concluyen sus actividades de secreción se transforma en parte en fibrocitos (estado de reposo) y en parte en miofibroblastos, que al igual que las células musculares lisas contienen actinomisina, proteína muscular con capacidad para generar fuerzas contráctiles que hacen posible la contracción. Ellos forman múltiples conexiones con la matriz, con los bordes de la herida y, entre ellos, a través de los desmosomas, lo que le permite traccionar la matriz cuando ellos se contraen, reduciendo el tamaño de la herida, así, agilizan el cierre de la herida” (p 60).

Estos eventos señalan el inicio del estado de maduración de la cicatrización de la herida (20, 21, 22).

1. REMODELACIÓN

Según Sporn, Roberts, Wakefield, & de Crombrughe (44) citados por Ormazabal (39):

“En esta etapa se produce el cese de la proliferación de células epidermales, remodelación de la matriz extracelular y muerte por apoptosis de los leucocitos que fueron reclutados a la herida, culminando con la formación de la cicatriz” (p7).

“La remodelación de la matriz extracelular (síntesis y degradación) es dirigida por TGF β y es favorecida por una disminución de la producción de metaloproteinasas (MMPs)” (p 7).

Según Goldman (45) citado por Ormazabal (39), “el aumento de expresión de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), y el aumento de la expresión de las proteínas de adhesión celular” (p 7).

Según Xue & Jackson (46) citados por Ormazabal (39). “En este proceso, el colágeno tipo III formado en las etapas anteriores es reemplazado por colágeno tipo I, un componente predominante en la dermis humana normal y que tiene mayor fuerza tensora” (p 7).

Según Ormazabal (39):

“La fuerza tensora del tejido dañado puede alcanzar entre un 50 a 80% con respecto a la piel no dañada. Aunque los epitelios reparados son casi igual que antes de la herida, el tejido de la cicatriz no es completamente igual que la dermis no herida. En la fase tardía de la maduración, la actividad celular se reduce, entonces la cicatriz, pierde su apariencia eritematosa debido principalmente a que los vasos sanguíneos son removidos por apoptosis. La etapa de maduración puede durar días incluso años” (p 7).

2.2.3. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

a. DEFINICIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

Según Carrillo et al. (5):

“El plasma rico en plaquetas es un derivado sanguíneo concentrado obtenido mediante centrifugación de la sangre extraída que se caracteriza por poseer una alta concentración de plaquetas (4 a 6 veces sus valores normales). La gran concentración de diversos factores tróficos contenidos en los gránulos de las plaquetas ha llevado a sugerir que la aplicación del plasma rico en plaquetas puede contribuir con estimular o acelerar la reparación y o la regeneración de diversos tejidos” (p 1).

“A pesar de la gran cantidad de publicaciones, tanto experimentales como clínicas, respecto de la utilidad del plasma rico en plaquetas en distintos ámbitos de la Medicina Regenerativa, pocas son las indicaciones en las que se encuentra plenamente demostrada su utilidad, hecho que pone de manifiesto la importancia de realizar estudios clínicos metodológicamente adecuados que permitan mejorar los niveles de evidencia sobre el uso del plasma rico en plaquetas” (p 1).

b. RELACIÓN CON LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

En el PRP, hay un mayor número de plaquetas y factores de crecimiento. Los siete factores de crecimiento en el PRP se pueden ver en Anexo 1, Fáundez (47).

Según Rodríguez *et al.* (48):

“Los gránulos α de las plaquetas contienen numerosas proteínas que influyen poderosamente en la cicatrización de las heridas. Entre ellas, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (que incluye los isómeros $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, y $\alpha\beta$), el factor de crecimiento transformante (TGF)- β (que incluye los isómeros $\beta 1$ y $\beta 2$), el factor plaquetario 4 (PF4), la interleuquina (IL)-1, el factor angiogénico derivado de las plaquetas (PDAF), el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PDEGF), el factor de crecimiento de células epiteliales (ECGF), el factor de crecimiento insulinalike (IGF), la osteocalcina, la osteoconectina, el fibrinógeno, la vitronectina, la fibronectina y la trombospondina (TSP)-1” (p 10).

Según Rodríguez *et al.* (48):

“Estas proteínas, denominadas proteínas secretoras, componen las familias de los factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas. Las proteínas secretadas por los gránulos α también juegan un papel en la defensa celular ante agentes exógenos en el lugar de la herida, mediante la producción de proteínas de señal que atraen a los macrófagos. Además, el PRP contiene un pequeño número de células leucocitarias que también contribuyen con la defensa celular, mediante la síntesis de interleuquinas que intervienen en la respuesta inmune inespecífica” (p 10).

Según Rodríguez *et al.* (48):

“La activación, también conocida como degranulación, provoca que los gránulos α se fundan con la membrana celular de las plaquetas, donde algunas de las proteínas secretoras (por ejemplo, PDGF y TGF- β) pasan al estado activo al añadirseles histonas y cadenas laterales de carbohidratos. Así, las proteínas son secretadas, permitiendo que se enlacen a los receptores de las células diana (por ejemplo, células madre mesenquimales, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales, o células epidérmicas). Una vez unidas a los receptores transmembrana, se activan las proteínas señalizadoras intracelulares, lo que lleva a la expresión de una secuencia de genes distintos en cada tipo celular) que dirigen la proliferación celular, la formación de la matriz, la producción osteoide, la síntesis de colágeno y otras acciones, en función del tipo de célula sobre el que actúen” (p 10).

c. PROCESAMIENTO DEL PRP Y SUS USOS

Según Mazzoca *et al.* (49) “La preparación del PRP es muy discutida debido a que hay diferentes formas de hacerlo, hay tres principalmente que se usan y son las más estudiadas” (p 309).

“PRPLP (Platelet Rich Plasma Lower Platelet) es una preparación en la cual se usa una sola centrifugación y produce un 50 % menos de concentración de plaquetas que otros métodos, también interviene el nivel de plasma que es tomado del tubo, ya que aquí no se toma en cuenta la cantidad de plasma que se usará para ser activado” (p 309).

“PRPHP (Platelet Rich Plasma High Platelet) es una preparación en la cual hay una mayor concentración de plaquetas y se usa una sola centrifugación, las diferencias con la anterior

son en cuanto al tipo de equipo que se utiliza, la velocidad a la que se gira, el tiempo por el cual se mantiene el movimiento y el estrato del cual se toma la cantidad de plasma a utilizarse ya que se toma el tercio inferior y no todo el plasma separado, produciendo hasta un 50 % de concentración más alta que la anterior” (p 309).

“PRPDS (Platelet Rich Plasma Doble Spin) es una forma de preparación del PRP en la cual se hace una doble centrifugación, separando primero a bajas revoluciones la sangre para separar las plaquetas de los demás compuestos celulares, estas luego son separadas en otro tubo estéril, el cual vuelve a ser centrifugado para separar en estratos las plaquetas, quedando la mayor concentración en el tercio bajo del plasma, siendo el verdadero PRP (plasma rico en plaquetas) y los otros dos tercios plasma pobre en plaquetas” (p 309).

Tanto las formas en que son procesadas como su uso pueden variar, según el objetivo final. Mazzoca *et al.* (49), en su trabajo sobre la evaluación de la concentración final del PRP, evidenciaron que el método que más concentración de plaquetas tiene es el PRPHP y que no hay una diferencia estadística significativa entre el PRPLP y el PRPDS, sin embargo, en sus comentarios finales ellos describen que el método puede ser elegido desde seleccionar el PRPHP para una lesión más compleja, como ayudar a reparar tendones o hueso a usar una técnica como PRPLP para ayudar a sanar una herida superficial en piel, además Zhou y Wang *et al.* (50) también comentaron que el uso del PRPHP presenta una mayor resistencia ante la contaminación de algunas bacterias *in vitro*, por lo que ayuda a que las heridas no presenten infecciones tan fácilmente como al no usarlo.

Numerosos autores describen que el uso del PRP conlleva beneficios para los pacientes (5-7) y muchos otros autores concuerdan en que promueve la angiogénesis, acelera la reparación de los tejidos y disminuye el tiempo de internamiento hospitalario con menores complicaciones.

Según Rodríguez *et al.* (48)

“Es probable que el efecto del PRP sobre la cicatrización de una herida sea función de muchas variables, entre ellas la concentración de plaquetas, el volumen añadido de PRP, la extensión y el tipo de la lesión y la condición médica global del paciente. El gran número de variables y su potencial interacción es la razón por la que no existe una recomendación única sobre el nivel de aumento de plaquetas que debe producir el PRP sobre la línea base para ofrecer sus efectos de la manera más óptima” (p 14).

“Algunos investigadores han sugerido que el PRP debería alcanzar una concentración en plaquetas de tres a cinco veces superior al nivel normal, aunque la relación entre el número de plaquetas y el beneficio clínico obtenido es uno de los parámetros que permanecen pendientes de determinar con exactitud. Se han publicado niveles de concentración que van desde menos de 2 hasta 8,5 veces el nivel normal o, incluso, que cada individuo necesita una concentración diferente de plaquetas para obtener un mismo beneficio clínico” (p 14).

“Aunque es imposible predeterminar la magnitud del efecto estimulador del proceso de curación de las heridas, mediante el empleo de PRP, por la gran variabilidad interindividual y la influencia de factores propios de cada caso y de cada herida en particular, lo que sí está científicamente demostrado es la correlación estadísticamente positiva entre la aplicación del mismo y el acortamiento temporal del proceso, gracias a su riqueza en factores de crecimiento y a sus propiedades mitogénicas y quimiotácticas. El PRP contiene una alta concentración de plaquetas, y consiguientemente, es rico en factores de crecimiento y de la coagulación” (p 14).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN Y AMBIENTE

Las cirugías se realizaron en una clínica veterinaria de la ciudad de Lima, Perú.

El análisis histológico se realizó en el Laboratorio de Patología de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Científica del Sur.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Para determinar el tamaño muestral, se utilizó la ecuación del cálculo para prueba de

hipótesis en una proporción de población para la cual, previamente, se hizo un estudio piloto.

El estudio piloto se hizo con fines de estandarizar todos los protocolos que iban a ser utilizados en el proyecto. Así mismo, para este se utilizó una fórmula para obtener el número de animales a emplear en el piloto (los datos para la formula se obtuvieron de trabajos similares).

Para determinar el tamaño de la muestra para el piloto, se empleó la ecuación de recursos desarrollada por Mead (51):

$$X = N / (A / 100)$$

Donde:

$N = 5$ (mínimo de unidades experimentales a emplear, en este caso, basados en trabajos similares y siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética Animal).

$A = 90 \%$ (teniendo en cuenta que el porcentaje de incidencias estimado es de 10%)

$X = 5 / (90 / 100) = 5.55$ Lo que equivale a seis animales.

Los resultados del estudio piloto establecieron que los tiempos de la resolución de la herida fueron los esperados y el 60% del grupo con tratamiento alcanzó los objetivos antes del tiempo promedio y solo un 20% del grupo sin tratamiento dio resultados similares.

Con estos datos, se procedió a determinar el tamaño de la población a utilizar en el experimento.

Para determinar el tamaño de la población, se empleó la ecuación del cálculo para prueba de hipótesis en una proporción de población (52):

$$n = \left[(Z_{\alpha} \sqrt{\pi_1(1 - \pi_1)} + Z_{\beta} \sqrt{\pi_0(1 - \pi_0)}) \div (\pi_1 - \pi_0) \right]^2$$

$$n = 12$$

La ecuación nos arroja que el total de animales a ser utilizados será de 12 conejos, lo que nos permite saber que los datos obtenidos tendrán una distribución normal, esto nos permite

tener un 95 % de confianza de que la población seleccionada fue representativa y minimizó los errores.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño de la investigación es de tipo experimental.

El tipo de muestreo es no probabilístico por conveniencia.

Unidad de análisis: heridas quirúrgicas de la cavidad abdominal en modelo animal (conejos: *Oryctolagus cuniculus*)

3.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Conejos (*Oryctolagus cuniculus*), machos enteros, sanos, un año de edad, con un peso de 2 kg (+/- 500 g), de la raza Nueva Zelanda, en buen estado de salud.

3.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Conejos que se encuentran bajo tratamiento o que presentaron alguna enfermedad durante el estudio.
2. Conejos que presentaron un proceso de infección asociado con la herida realizada en las primeras 24 horas.
3. Conejos que fallecieron durante el experimento.

3.4 PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

Para este estudio, se realizó la búsqueda de información relacionada con los procesos de cicatrización de los tejidos y el uso de productos nuevos para promover la reparación de los tejidos lesionados por la cirugía, así como el uso del PRP en diferentes áreas de la medicina y su efecto sobre los tejidos.

De acuerdo con la bibliografía recopilada, se determinó que se harían evidentes los procesos de reparación de una manera más didáctica en los días 1, 3, 6, 10 y 14. Se describió que mantener los puntos de sutura por más de 14 días no es necesario, ya que el proceso de reparación bajo condiciones normales debería terminar entre el día 7 y 10, así como mantenerlos por más de 14 días puede traer algunas complicaciones reportadas como disidencias, ceromas e infecciones (1-2-53-57).

Los conejos utilizados estaban en buen estado de salud, descartando problemas mediante un examen clínico general. Todos los animales pasaron un periodo de una semana en las baterías de metal de 40 cm de ancho x 70 cm de largo y 40 cm de alto, tiempo en que se les vigiló para considerarlos sanos, si es que no desarrollaban ninguna patología en ese tiempo. Su alimentación fue en base de fibra vegetal (alfalfa y panca) dada en raciones al día *ad libitum*, es decir, todo el tiempo tenían alimento en las jaulas. Pasado el tiempo de prueba, se procedió a realizar una toma de muestra de sangre para realizar un hemograma y ver que no presentaron anormalidades.

Se realizó un estudio piloto para estandarizar el sistema de obtención de plaquetas mediante centrifugación, las cuales pasaron por un conteo en cámara de Neubaur para saber que había la cantidad escogida de plaquetas que sería 5 veces la concentración basal, esto basado en trabajos como los de DeRossi *et al.* (10), Correa *et al.* (54), Ostvar *et al.* (58) y Jee *et al.* (59), esto teniendo en cuenta el hemograma basal promedio de los conejos (266×10^3 plaquetas/ μL en promedio), finalmente fueron numerados en cada oreja para poder ser diferenciados. También el estudio sirvió para escoger el sistema más adecuado de obtención de sangre, el manejo anestésico, el manejo post operatorio y cantidad de animales a utilizar en el estudio, tras lo cual se procedió a desarrollar la parte práctica de la tesis.



Imagen 1. Conejo siendo preparado

Los animales, antes de la cirugía, fueron hidratados con 4.5 ml/kg de suero salino subcutáneo y contaron con un ayuno de no más de tres horas para evitar problemas de hipoglucemia y deshidratación, cabe mencionar que los animales estaban sanos y sin problemas, sin embargo, se siguió esto de manera protocolar ya que en otros trabajos con conejos se seguían estos pasos de manera preventivas (Imagen 1) (27).

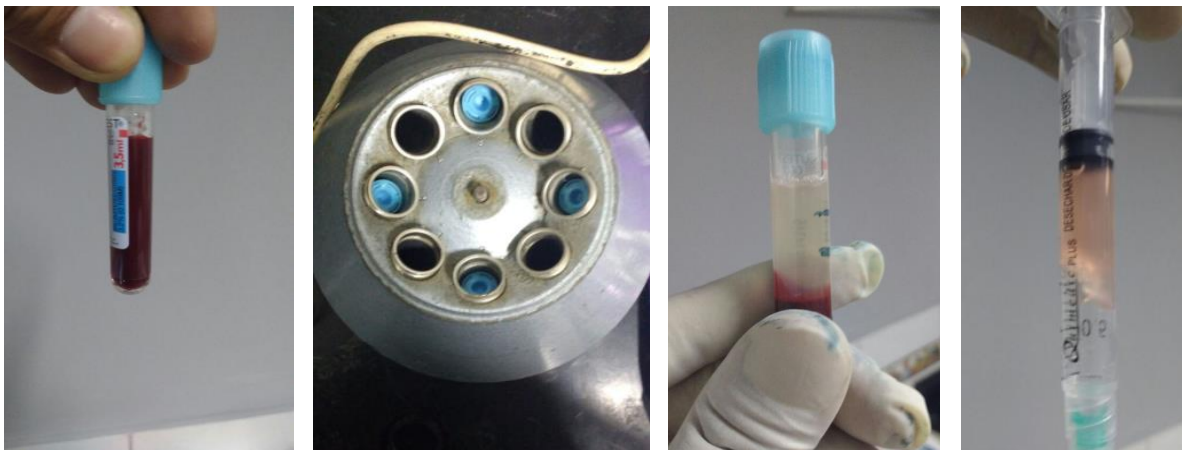


Imagen 2. Extracción de sangre, centrifugación, separación del plasma rico en plaquetas y plasma activado con gluconato de calcio

El PRP fue preparado bajo las recomendaciones de Moreno *et al.* (65)

“A partir de la sangre de los animal se preparó el PRP, para lo cual, previo a la cirugía, se le extrajo 5 ml de sangre de la vena yugular que fueron puestos en tubos de citrato sódico. Se centrifugó la muestra por 1.5 minutos a 1.200 rpm (280 G), a temperatura ambiente, llevándolo a cinco veces la concentración basal de plaquetas en sangre. El plasma luego fue separado mediante pipeteado muy meticuloso para no crear turbulencias en las fracciones obtenidas. Los primeros 0.5 ml (Fracción 1) fueron plasma pobre en plaquetas y, por lo tanto, pobre en factores de crecimiento. Los siguientes 0.5 ml (fracción 2) corresponden a un plasma con un número de plaquetas similar al que tiene la sangre periférica. La fracción de plasma rica en plaquetas y factores de crecimiento fueron los 0.5 ml que se encuentran encima de la serie blanca (fracción 3). Con una pipeta de 500 ul, se aspiró la fracción 1 y se trasladó a un tubo estéril, previamente etiquetado. Con la misma pipeta (diferente punta estéril), se aspiró la fracción 2 de todos los tubos y, al igual que con la fracción 1, se lleva a otro tubo estéril etiquetado, que contuvo, entonces, un plasma con una concentración de plaquetas similar a la de la sangre periférica. Para la fracción 3, se realizó un pipeteado más cuidadoso, con una pipeta de 100 ul, para evitar las eventuales turbulencias que se pudieron producir, y de este modo no aspirar los hematíes ni la serie blanca. Se repitió este proceso, colectándose lo obtenido en un tercer tubo estéril y etiquetado, el cual contendrá el PRP” (p 132).

Una vez obtenido, se añadió 0.05 ml de gluconato de calcio al 10 % por cada ml de PRP (proporción PRP – gluconato de calcio 9:1) (Imagen 2) (60).

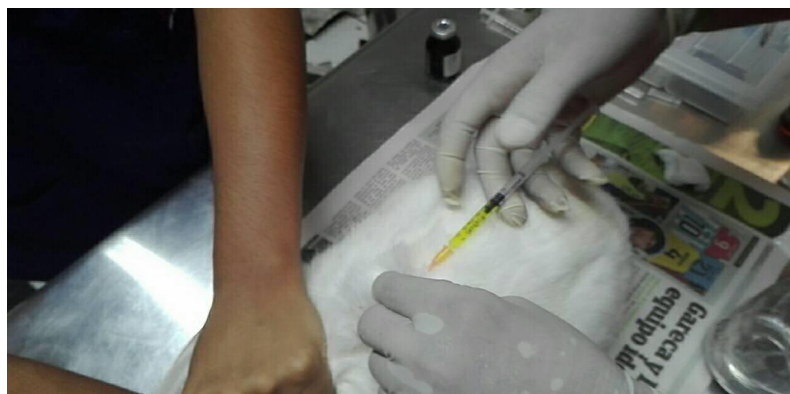


Imagen 3. Conejo siendo sedado para un mejor manejo y preparación

La anestesia consistió en 1mg/kg de maleato de acepromazina con 30 mg/kg de clorhidrato de ketamina y, para un mejor manejo del dolor, durante la incisión se hizo una insensibilización del área abordada, utilizando clorhidrato de lidocaína al 2 % a un volumen total de 1.5 ml dividido en 4 infiltraciones. Para ello, se usó una técnica en rombo, la cual consistió en usar como referencia el tercio medio del abdomen y usar cuatro infiltraciones en ángulos de 45° alrededor del área tras lo cual se esperó 4 minutos antes de poder hacer las incisiones (Imagen 3).

Para el manejo post operatorio, se les aplicó a los animales 4 mg/kg de clorhidrato de tramadol, cada 12 horas, durante 3 días, junto con esto se le dio como antibiótico clorhidrato de enrofloxacin a una dosis de 5 mg/kg cada 24 horas y meloxicam a dosis de 0.2 mg/kg, el primer día, y cada 24 horas 0.1 mg/kg, en dos dosis más, en el mismo espacio de tiempo como antiinflamatorio. Si bien es conocido que el uso de AINEs puede retrasar la cicatrización de las heridas al actuar sobre la vía de las ciclooxigenasas y disminuir el desarrollo del proceso inflamatorio, proliferativo y agregación plaquetaria, se decidió utilizar meloxicam, esto debido a que en los pilotos previos hubo problemas con el manejo del dolor post operatorio solo usando tramadol donde 5 de los 12 animales presentaron fastidio, se sacaron la gasa que cubría la herida y quitaron puntos, tras lo cual 3 desarrollaron infección de la herida y si bien fueron pocos animales al ser un estudio experimental todo debía ser estandarizado. Según Clemente *et al.* (61) el meloxicam puede tener efectos contraproducentes en la recuperación del tejido pero a su vez este tiende a ser menos nocivo que otros antiinflamatorios en efectos de cicatrización. En la evaluación macroscópica y microscópica del estudio piloto no hubo diferencias significativas en cuanto a el desarrollo del proceso inflamatorio ni proliferativo sin embargo hubo una mejor tolerancia a la herida por parte de los animales por lo que se decidió a utilizarlo teniendo en cuenta antecedentes del uso de AINEs en tesis sobre la evaluación del proceso de cicatrización en heridas quirúrgicas por primera intención, Rueda (2).

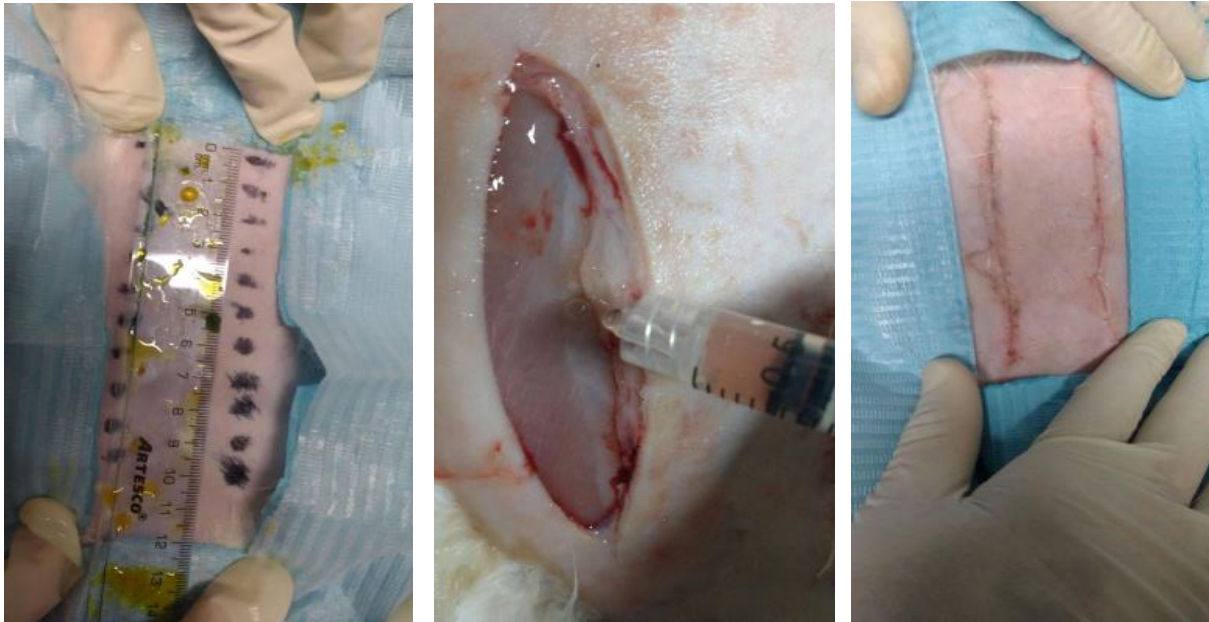


Imagen 4. Marcaje de los espacios entre cada punto, aplicación del PRP y sutura de los espacios marcados

Se realizó una tricotomía en la zona abdominal donde se hizo un marcaje con plumón quirúrgico de 10 cm, previa desinfección con digluconato de clorhexidina al 2 %, esto se hizo con el fin de que todos los animales tengan el mismo tamaño del corte al abordaje, luego se incidió la piel. El objetivo, al ser la evaluación de una herida en piel por un corte quirúrgico de primera intención, hizo que se incidiera la dermis, epidermis y tejido subcutáneo, sin llegar el músculo recto abdominal. Se aplicó el PRP, antes del cierre de la piel, a lo largo de toda la herida, de manera que la fracción de PRP entró en contacto con toda ella. Luego de esto, se cerró utilizando nylon 2-0 de aguja recta no reabsorbible usando un patrón discontinuo simple con espacios intermitentes de 1 cm cada uno (Imagen 4).

El trabajo se hizo con 12 animales, siendo cada uno control y tratamiento, al mismo tiempo, ya que se hicieron dos cortes paralelos en el abdomen, se designó el lado derecho como controles y los del lado izquierdo como tratamientos, estos fueron comparados hasta el día que se quitaron los puntos, esto fue a los 14 días después de la cirugía.

Las heridas del grupo experimental recibieron tratamiento en las heridas quirúrgicas con plasma rico en plaquetas antes de ser suturadas con 0.5 ml de este como única aplicación, las cuales fueron curadas diariamente con yodo povidona y cubiertos con gasas.

Los pacientes del grupo control fueron manejados únicamente con limpiezas diarias de yodo povidona.



Imagen 5. Toma de muestra con sacabocados

En los días que se realizó el muestreo, se fotografiaron las heridas antes de biopsiar el segmento escogido, de tal manera, que se pudiera evaluar el segmento de manera macroscópica o clínica para verificar la presencia de exudado, coloración, edema y correcta aposición de los márgenes de la herida. Antes de la toma de muestra, se hizo una sedación usando clorhidrato de ketamina 5mg/kg/peso con maleato de acepromacina 1 mg/kg/peso, la cual se aplicó de manera intramuscular, luego a los lados de la herida se aplicó clorhidrato de lidocaína a un volumen de 0.2 ml de manera subcutánea (Imagen 5).



Imagen 6. Muestras envasadas para ser llevadas al laboratorio y ser procesadas para su evaluación histológica

En cada paciente, se realizó una biopsia empleando un sacabocados, la muestra se colocó en formol e identificó según el código del mismo, posteriormente, se procedió a realizar cortes histológicos los que se colorearon con hematoxilina eosina (Imagen 6).

Las muestras de biopsia fueron derivadas al Laboratorio de Patología de la Universidad Científica del Sur donde se evaluaron mediante conteos por campo, a un aumento de 1000x en microscopio. Por cada muestra, se tomó fotos de cuatro segmentos del área y se hizo un conteo de la cantidad de células presentes, así como el reporte de cualquier otra anomalía presente en las láminas.

Las láminas, a continuación, contienen características macroscópicas y formas celulares microscópicas que fueron evaluadas en el proyecto, conforme se explicó.

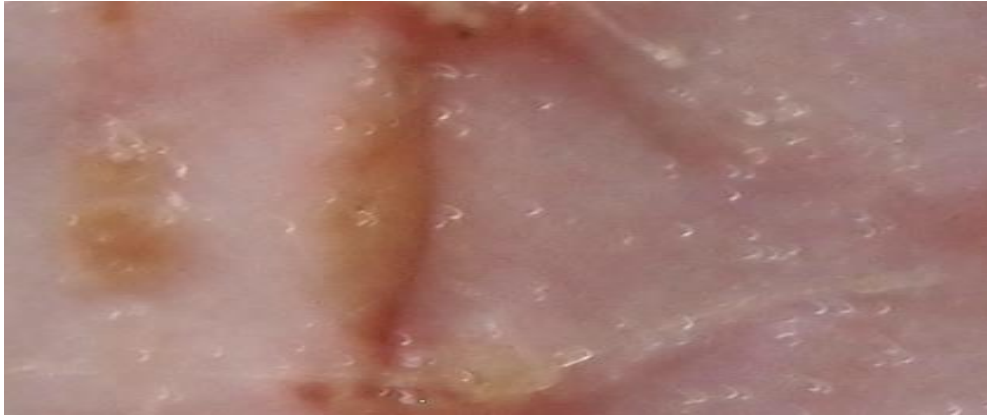


Imagen 7. Segmento evaluado de la herida quirúrgica con presencia de edema leve, color rosado concorde con el de la piel, sin presencia de exudado y mala aposición de los bordes de la herida



Imagen 8. Segmento evaluado de la herida quirúrgica con moderada presencia de edema, color rojizo intenso, leve presencia de exudado y mala aposición de los bordes de la herida

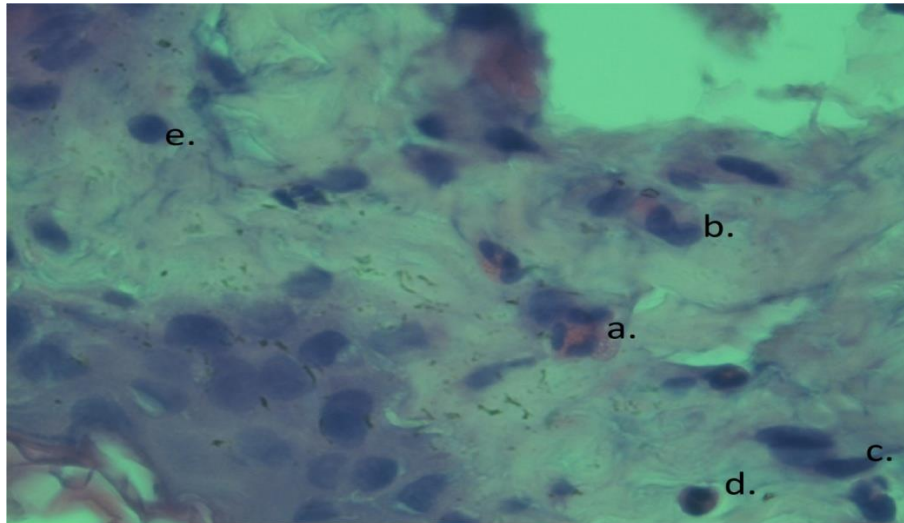


Imagen 9. (a y d) Polimorfonuclear (Neutrofilo), (b y c) Monocito y (e) linfocito

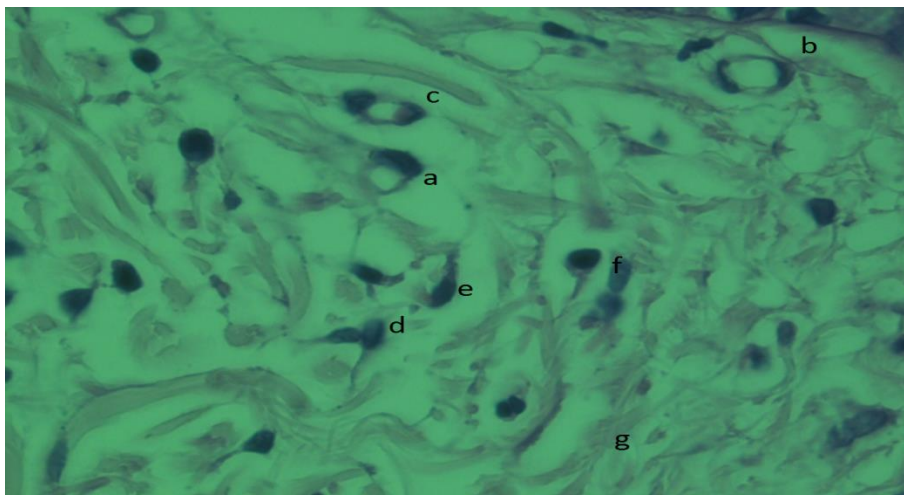


Imagen 10. (a, b, c) Vasos sanguíneos neoformados (d, e, f), fibroblastos (g) y fibras de colágeno

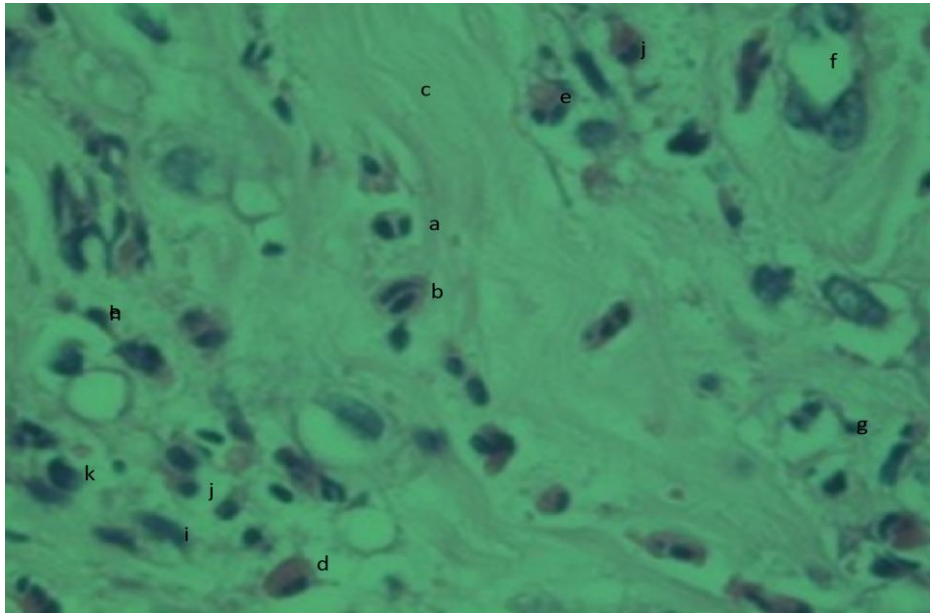


Imagen 11. (a, b, d, e) Polimorfonucleares, (c) fibras de colágeno organizándose, (f) vasos sanguíneos neoformados, (g, h, i) fibroblastos, (j) linfocito y (k) macrófago

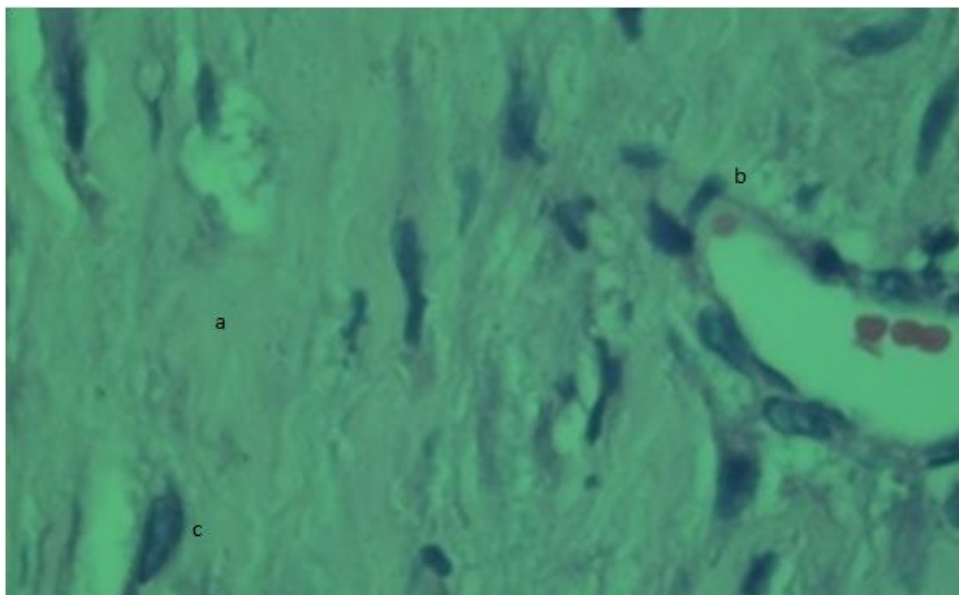


Imagen 12. a. Colágeno nuevo y organizado b. Vasos sanguíneos formados y c. Fibroblastos

Se usaron dos fichas de recolección de datos, tanto para la evaluación macroscópica como microscópica las cuales, una vez terminadas, se usaron para catalogar el estado de recuperación del tejido a nivel macroscópico como microscópico, luego estos datos fueron introducidos en la base de datos del programa estadístico SATATA 14 para la evaluación estadística final.

3.5 MATERIALES Y EQUIPOS

1. Centrífuga para PRP (Marca SHUNMA) de ocho espacios modelo 800
2. 12 conejos machos de la raza Nueva Zelanda blanco de un año de edad
3. 20 sacabocados del N.º 4
4. 36 frascos para transportar muestras de biopsia
5. 1 cámara fotográfica marca CANON t5i
6. 24 tubos de extracción de sangre/c citrato sódico
7. 12 ampollas de gluconato de calcio de 10 ml
8. 12 baterías para conejos de bandeja removible
9. Una caja de Nylon quirúrgico (sutura no reabsorbible estéril monofilamento) 2/0 punta círculo cortante 70 cm
10. Clorhidrato de ketamina (50 ml)
11. Un frasco de Maleato de acepromacina (50ml)
12. Un frasco de Clorhidrato de tramadol (50 ml)
13. Un frasco de Meloxisan (50ml)
14. Un frasco de clorhidrato de enrofloxacin al 5% (50 ml)
15. Un frasco de clorhidrato de lidocaína al 2%(20ml)
16. Un kit de disección anatómica
17. 20 abocats N.º 24

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

1. Se utilizó el programa de Microsoft Excel y el programa SPSS versión 20.0 para obtener los datos para la prueba piloto y saber las proporciones esperadas de ocurrencia y no ocurrencia en la población, ésta, a su vez, nos dio los datos para la ecuación del cálculo para la prueba de hipótesis en una proporción de población y tener el tamaño de la población a ser utilizada en el desarrollo de la tesis. Para el desarrollo de la parte práctica de la tesis, se usaron dos fichas para recolectar datos, tanto para la evaluación macroscópica como la microscópica, esto con el fin de ordenar las características cuantitativas y cualitativas. Para determinar el efecto de la variable tratamiento con PRP sobre la cicatrización de las heridas, se utilizó el programa STATA 14 para el análisis de datos y, así, evaluar estos resultados por día. Esto se hizo aplicando el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para saber si el nivel de recuperación era estadísticamente significativo o no. Los cálculos se realizaron con un nivel de confianza de 95 %.
2. La evaluación de las características macroscópicas y microscópicas se hicieron bajo los parámetros de la ficha 1 (Anexo 2) y ficha 2 (Anexo 3) respectivamente.
3. La presentación final de los datos de manera cuantitativa y porcentual de las características microscópicas se hizo bajo la ficha 3. (Anexo 4)
4. La evaluación total del estado de recuperación del tejido a nivel macroscópico y microscópico se hizo bajo la clasificación de la tabla 3 (Anexo 5) y tabla 4 (Anexo 6) respectivamente.
5. El análisis de supervivencia se hizo, tanto de manera macroscópica como microscópica, con el programa SPS versión 20.
6. Se presentaron los resultados en un cuadro comparativo en el que se comparaba porcentualmente el grupo control y el grupo tratamiento por día.

IV. RESULTADOS

Análisis macroscópico:

1. Día 1:

- a. En el grupo control, se observó que el 50 % (6/12) de los conejos presentaron escasa cantidad de exudado, mientras que el otro 50 % (6/12) presentó ausencia de ésta, en comparación con el grupo tratamiento que tuvo en un 66.6 % (8/12) de los animales ausencia de exudado en la herida y un 33.3 % (4/12) la presentó de manera escasa.
- b. La coloración en el grupo control presentó un color rojizo correspondiente con la inflamación del tejido en el 75 % (9/12) de los animales y solo un 25 % (3/12) no presentó esta coloración, siendo ausente para ellos, en comparación con el grupo tratamiento, en el 33.3 % (4/12) de estos presentaron el color rojizo, correspondiente con la inflamación y el 66.6 % (8/12) no lo presentaron siendo ausente para estos.
- c. Con respecto del edema, el 50 % (6/12) del grupo control presentó una escasa cantidad de este, mientras que el otro 50 % (6/12) no la presentó, siendo esta característica ausente para ellos. En contraste, el grupo tratamiento presentó un 33.3 % (4/12) de animales con una cantidad escasa de esta, mientras que para el otro 66.6 % (8/12) de estos fue ausente.
- d. En cuanto al afrontamiento correcto de los bordes, el 100 % (12/12), en ambos grupos, fue calificado como muy malo.

2. Día 3:

- a. En el 50 % (6/12) de los animales, tanto en el control como el tratamiento con PRP, tuvieron una presencia moderada de exudado, mientras que el otro 50 % (6/12) de ambos grupos fue calificado como escasa cantidad de exudado.

- b. El 100 % (12/12) de los animales, tanto en el grupo control como el tratamiento con PRP, presentó un color rojizo característico de la inflamación.
- c. La presencia de edema en el grupo control fue de un 25 % (3/12) escasa, 58.3 % (7/12) moderada y 16.6 % (2/12) abundante, mientras que para el grupo tratamiento con PRP fue un 33.3 % (4/12) escasa, 33.3 % (4/12) moderada y un 33.3 % (4/12) abundante.
- d. En cuanto al afrontamiento correcto de los bordes de la herida, ambos grupos tuvieron una muy mala calificación en un 100 % (12/12) sin haber diferencia.

3. día 6 :

- a. Tanto el grupo control como el tratamiento no presentaron exudado en el 100 % (12/12) de los individuos.
- b. En el grupo control, el 50 % (6/12) de los animales presentaron un color rojizo correspondiente con la inflamación, mientras que el otro 50 % (6/12) presentó un color rosado normal en comparación con el grupo tratamiento con PRP, en el que el 33.3 % (4/12) presentó un color rojizo correspondiente con la inflamación y el otro 66.6 % (8/12) no presentó color alguno y la piel tenía un tono rosado normal.
- c. En el grupo control, el 16.6 % (2/12) de los animales presentó edema moderado, el 41.6 % (5/12) escaso y el 41.6 % (5/12) ausente, mientras que el tratamiento con PRP presentó un 33.3 % (4/12) de escaso edema y un 66.6 % (8/12) ausente.
- d. En cuanto al correcto afrontamiento de los bordes de la herida, para el 100 % (12/12) del grupo control la calificación fue mala en comparación con el grupo tratamiento con PRP, en el cual el 33.3 % (4/12) fue mala y un 66.6 % (8/12) fue buena

4. Día 10:

- a. La presencia de edema fue ausente para el 100 % (12/12) de los animales, tanto en el grupo control como en el tratamiento con PRP.
- b. En cuanto a la coloración, el 33.3 % (4/12) del grupo control presentó la coloración rojiza, mientras que el 66.6 % (8/12) tenía un color rosado normal, por otro lado, el grupo tratamiento con PRP presentó en el 100 % (12/12) de los individuos un color rosado normal.
- c. En el grupo control, el 16.6 % (2/12) de los casos presentó escasa cantidad de edema, mientras que para 83.3 % (10/12) fue ausente, en comparación con el grupo tratamiento con PRP, que tuvo el 100 % (12/12) de los individuos con ausencia de edema.
- d. Finalmente, en el grupo control el 100 % (12/12) de los individuos presentaron un buen afrontamiento de los bordes de la herida, en comparación con el grupo tratamiento, el cual presentó en un 25 % (3/12) un buen afrontamiento de los bordes de la herida y el 75 % (9/12) un muy buen afrontamiento de los bordes de la herida.

5. Día 14:

- a. Tanto el grupo control como el tratamiento presentaron un 100 % (12/12) de individuos con ausencia de exudado, coloración rosada normal, ausencia de edema y una muy buen afrontamiento de los bordes de la herida sin evidencia visual de cicatriz.

Cuadro 1: Evolución de los grupos evaluados macroscópicamente expresados en porcentaje

		Tiempos									
		Día 1		Día 3		Día 6		Día 10		Día 14	
Estados		C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Sin resolución	N	12	12	8	6	0	0	0	0	0	0
	%	100	100	66.6	50	0	0	0	0	0	0
Poco resuelto	N	0	0	4	6	12	8	0	0	0	0
	%	0	0	33.3	50	100	66.6	0	0	0	0
En proceso	N	0	0	0	0	0	4	12	3	0	0
	%	0	0	0	0	0	33.3	100	25	0	0
Avanzado	N	0	0	0	0	0	0	0	9	12	12
	%	0	0	0	0	0	0	0	75	100	100
Total	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

C: control T: tratamiento

En la tabla 1, observamos que, en el día 1, ambos grupos empiezan con heridas sin resolución (mal afrontamiento de los bordes de la herida, escasa a moderada presencia de exudado, piel rojiza inflamada y edema escaso a moderado) conforme van pasando los días, los estados de las heridas van progresando, se aprecian ligeras diferencias entre ambos grupos, acentuándose la brecha entre ellas hasta el día 10, es así que se muestra que el grupo tratamiento tiene una mejora un poco más rápida durante los días 3, 6 y 10 que el grupo control. En el día 14, podemos apreciar que ambos grupos llegaron a una curación avanzada (muy buen afrontamiento de los bordes sin visualización de cicatriz, exudado ausente, coloración rosada normal y edema ausente).

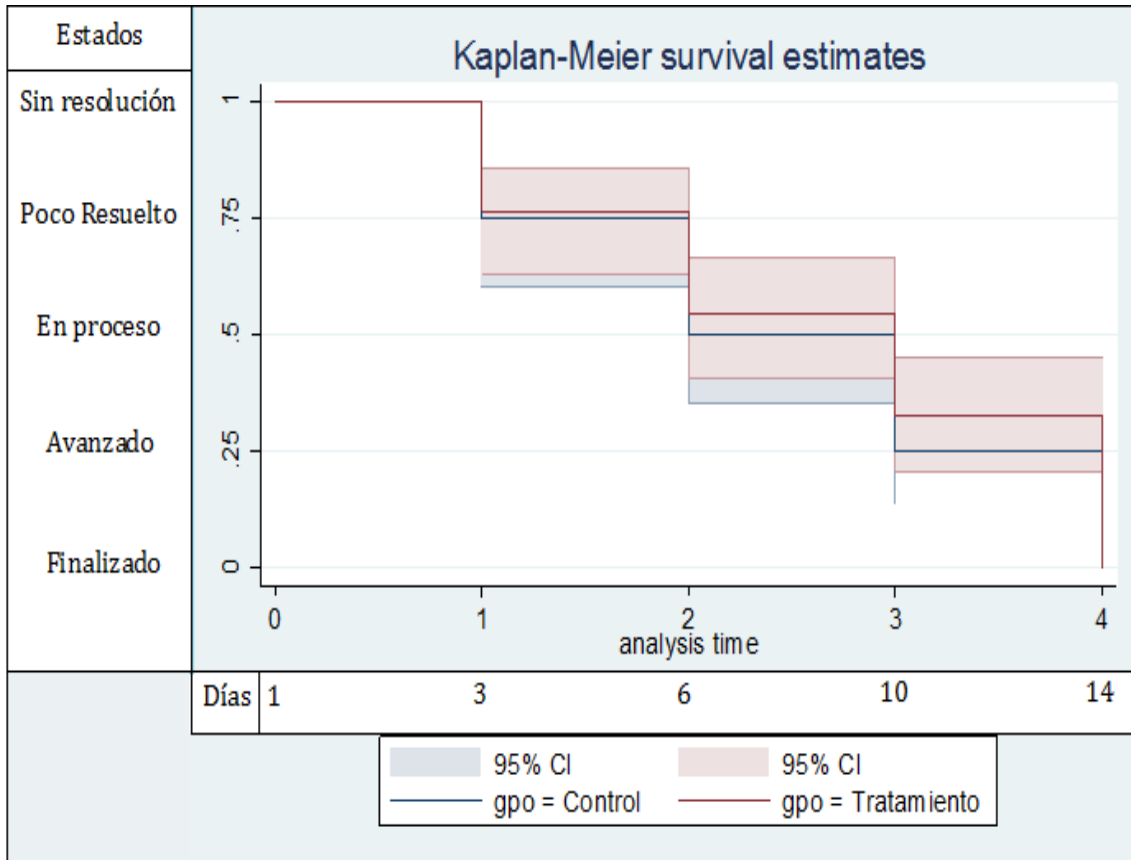


Gráfico 1. Análisis de supervivencia Kaplan-Meier. Registro de datos del tiempo de la resolución de la herida de los individuos evaluados de manera macroscópica

Mediante la metodología de análisis de supervivencia, donde el evento de análisis es resolución de la herida, se presenta la gráfica de cicatrización en función del tiempo, según grupos evaluados, grupo control y tratamiento. El gráfico 1, muestra que ambas líneas se superponen hasta el tiempo 1 de evaluación (día 3), posteriormente, en el resto del evento se observa una ligera diferencia, la cual no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Se concluye que ambos grupos de experimentación no presentan diferencias estadísticas en la resolución de la herida.

Observamos que, en el tiempo 0, ambas líneas están unidas, por lo tanto, el grupo control y el tratamiento no presentan ninguna diferencia estadística. Conforme van pasando los días, se observa que las líneas se van separando, lo que muestra que el grupo tratamiento tiene una mejora un poco más rápida durante los tiempos 1 (día 3), 2 (día 6) y 3 (día 10). En el

tiempo 4 (día 14), podemos apreciar que ambos grupos llegaron a ser iguales, por lo que podemos decir que la herida no se resuelve en menos tiempo, tampoco se puede afirmar que, en algún momento de la evaluación, hubo una diferencia estadística significativa entre ambos grupos, ya que aunque se ve una resolución más efectiva por parte del grupo tratamiento en el tiempo 3 (día 10), al análisis estadístico de la prueba, nos dice que esta no representa una diferencia considerable como para afirmar que el PRP hizo una diferencia en la curación de la herida. Por lo tanto, concluimos que, a nivel macroscópico, durante todo el evento el efecto del PRP no puede considerarse determinante a nivel estadístico entre el control y el tratamiento a nivel macroscópico.

En el anexo 7, imagen 1, se muestra la evolución del proceso de cicatrización a nivel macroscópico.

Análisis microscópico:

El patrón de evolución de la herida en el tratamiento y control se estudió mediante el examen histológico de las biopsias a los días 1, 3, 6, 10 y 14 días:

6. Día 1:
 - a. Tanto el grupo control como el tratamiento con PRP presentaba, en un 83.3 % (8/12), abundantes polimorfonucleares y teniendo solo un 16.7 % (2/12) como moderada cantidad.
 - b. En cuanto a los linfocitos en el grupo control, solo el 25 % (3/12) presentó una escasa cantidad, mientras que para el otro 75 % (9/12) restante fueron ausentes, en contraste con el grupo tratamiento con PRP, el 41.6 % (5/12) presentó una cantidad abundante, el 16.7 % (2/12) una cantidad escasa y el otro 41.6 % (5/12) ausencia de esta.

- c. En cuanto a la presencia de macrófagos en el grupo control, el 58.3 % (7/12) fue abundante y el otro 41.6 % (5/12) fue ausente en comparación con el grupo tratamiento, en el cual el 41.6 % (5/12) tuvo una abundante cantidad de macrófagos, un 16.7 % (2/12) lo presentó en una cantidad moderada y el otro 41.6 % (5/12) de estos estuvo ausente.
- d. Por otro lado, tanto para la cantidad de fibroblastos, como de angiogénesis, este fue 100 % (12/12) ausente tanto para el control como el grupo tratamiento.
- e. Otros datos adicionales encontrados en la lámina fueron que no se encontró producción de colágeno nuevo en ninguno de los dos grupos, sin embargo, se pudo observar restos de colágeno maduro típico de los bordes adyacentes de la piel sin lesión previa, pero esta no tiene valor al hallazgo, ya que no es parte del proceso de reparación del tejido.

7. Día 3:

- a. La cantidad de polimorfonucleares para el grupo control fue: en un 33.3 % (4/12) abundante, 16.7 % (2/12) moderada, 16.7 % (2/12) escaso y un 33.3 % (4/12) ausente, en comparación con el grupo tratamiento, este presentó 16.7 % (2/12) de abundantes polimorfonucleares, 8.3 % (1/12) en moderada cantidad, 58.3 % (7/12) en escasa cantidad y un 16.7 % (2/12) presentó ausencia de estas.
- b. En cuanto a los linfocitos en el grupo control, el 16.7 % (2/12) presentó una escasa cantidad y el 83.3 % (10/12) restante presentó ausencia de estas, mientras que para el grupo tratamiento con PRP, la cantidad fue moderada para un 25 % (3/12) de los individuos y un 75 % (9/12) presentó ausencia de estas.
- c. El grupo control presentó un 25 % (3/12) de abundante cantidad de macrófagos, 16.7 % (2/12) moderada cantidad, 33.3 % (4/12) escasa y 25 % (3/12) ausente, en

contraste con el grupo tratamiento que presentó un 58.3 % (7/12) de escasos macrófagos y un 41.7 % (5/12) ausencia de estos.

- d. Para el conteo de fibroblastos, en el grupo control el 33.3 % (4/12) presentó una abundante cantidad, el 16.7 % (2/12) una moderada cantidad, 16.7 % (2/12) una escasa presencia de estas y el 33.3 % (4/12) fue ausente para esta característica, en comparación con el grupo tratamiento, estos presentaron un 16.7 % (2/12) de abundancia de estos, 50 % (6/12) moderada cantidad, 16.7 % (2/12) escasa cantidad y el 16.7 % (2/12) fue ausente.
- e. Finalmente, para los vasos nuevos en el grupo control, el 25 % (3/12) presentó una abundante cantidad, el 16.7 % (2/12) una moderada cantidad, el 33.3 % (4/12) una escasa cantidad y el 25 % (3/12) fue ausente para esta característica, en comparación con el grupo tratamiento el 16.7 % (2/12) de estos presentó una cantidad abundante, un 33.3 % (4/12) moderada cantidad y en un 50 % (6/12) fue escasa la cantidad.
- f. Otras características observadas en las láminas fueron que en el grupo control la producción de colágeno nuevo se encontró: en el 25 % (3/12) de los individuos en una escasa cantidad, mientras que el otro 75 % (9/12) no la presentó por lo que estuvo ausente, en contraste con el grupo tratamiento que presentó una escasa producción de colágeno en el 75 % (9/12) de los individuos y esta estuvo ausente en el 25 % (3/12) del resto.

8. Día 6:

- a. La presencia de polimorfonucleares en el grupo control fue en un 58.3 % (7/12) abundante, 16.7 % (2/12) moderado y un 25 % (3/12) ausente, mientras que para el grupo tratamiento, el 33.3 % (4/12) fue abundante, el 41.7 % (5/12) moderado y un 25 % (3/12) ausente.

- b. La presencia de linfocitos en el grupo control fue en un 41.7 % (5/12) escaso y en un 58.3 % (7/12) estuvo ausente, para el grupo tratamiento con PRP, el 16.7 % (2/12) fue escasa y el 83.3 % (10/12) no las presentó, siendo ausentes.
- c. En cuanto a los macrófagos, en el grupo control, el 25 % (3/12) presentó una moderada cantidad, el 16.7 % (2/12) una escasa cantidad y en el 58.3 % (7/12) restante estuvieron ausentes, en cuanto al grupo tratamiento el 33.3 % (4/12) presentó una moderada cantidad, el 16.7 % (2/12) una cantidad escasa y el 50 % (6/12) restante fue ausente para este tipo de células.
- d. En cuanto a la cantidad de fibroblastos, el grupo control presentó una cantidad abundante en el 100 % (12/12) de los individuos, mientras que en el grupo tratamiento el 83.3 % (10/12) de estos presentó una cantidad abundante y el 16.7 % (2/12) restante la presentó en una cantidad moderada.
- e. Finalmente, la presencia de vasos sanguíneos nuevos fue tanto para el grupo control como para el tratamiento de un 83.3 % (10/12) abundante y el 16.7 % (2/12) restante moderado.
- f. Otros hallazgos al observar la lámina fueron que, en el 100 % (12/12) del grupo control, se observó una escasa cantidad de colágeno nuevo organizándose, mientras que el grupo tratamiento con el PRP presentó en un 41.6 % (5/12) una escasa organización de colágeno, mientras que el otro 58.3 % (7/12) de individuos presentó una organización moderada de colágeno nuevo.

9. Día 10:

- a. La cantidad de polimorfonucleares en el grupo control fue abundante en el 41.7 % (5/12) de los individuos, en el 16.7 % (2/12) escaso y en el 41.7 % (5/12) fue ausente en estos, mientras que para el grupo tratamiento con PRP, solo el 25 % (3/12)

presentó polimorfonucleares en una cantidad abundante, el 16.7 % (2/12) fue moderada, 16.7 % (2/12) escaso y el 41.7 % (5/12) no los presentó, por lo que estuvo ausente en ellos.

- b. En cuanto a los linfocitos, en el grupo control el 16.7 % (2/12) fue abundante, el 41.7 % (5/12) fue escaso y el otro 41.7 % (5/12) no los presentó, por lo que fue ausente para ellos, mientras que para el grupo tratamiento con PRP, el 16.7 % (2/12) tuvo una cantidad escasa y el 83.3 % (10/12) restante no lo presentó, por lo que estuvo ausente.
- c. La cantidad de macrófagos en el grupo control fue ausente en el 100 % (12/12) de los individuos y para el grupo tratamiento con PRP fue escaso en el 16.7 % (2/12) de los casos y ausente en el 83.3 % (10/12) restante.
- d. En cuanto a los fibroblastos, en el 100 % (12/12) de los casos, tanto para el grupo control como para el tratado con PRP, fueron abundantes.
- e. Finalmente, la presencia de vasos sanguíneos nuevos fue, tanto para el grupo control como para el tratamiento, abundante en un 66.7 % (8/12) y moderado en un 33.3 % (4/12).
- f. Otras características observadas en la lámina fueron que el grupo control presentó en el 41.6 % (5/12) de los individuos una escasa formación de colágeno nuevo, un 50 % de una moderada cantidad de colágeno nuevo y solo un 8.3% (1/12) de colágeno en una cantidad abundante, por otro lado, el grupo tratamiento presentó un 16.6% (2/12) de escasa formación de colágeno nuevo, un 33.3 % (4/12) en moderada cantidad y un 50 % (6/12) abundante.

10. Día 14:

- a. El grupo control presentó un 16.7 % (2/12) de polimorfonucleares de manera moderada, mientras que el 83.3 % (10/12) no los presentó, siendo ausentes para estas.

Mientras que para el grupo tratamiento con PRP, el 100 % (12/12) de los casos no presentó polimorfonucleares.

- b. En cuanto a la presencia de linfocitos, tanto para el grupo control como para el grupo tratamiento, tuvieron ausencia de estos en un 100 % (12/12).
- c. En el caso de los macrófagos, ambos grupos, control y tratamiento tuvieron un 100 % (12/12) de macrófagos ausentes.
- d. En cuanto a la presencia de fibroblastos, tanto para el grupo control como para el tratamiento con PRP tuvieron un 100 % (12/12) de abundancia.
- e. Finalmente, para la presencia de vasos sanguíneos nuevos, en el grupo control hubo un 83.3 % (10/12) de animales con abundante cantidad de estas y un 16.7 % (2/12) en moderada cantidad, en comparación con el grupo tratamiento con PRP, el cual tuvo un 58.3 % (7/12) de abundantes capilares, 25 % (3/12) moderada cantidad y un 16.7 % (2/12) en escasa cantidad.
- f. Otras características que se observaron fueron que el 100 % (12/12) de individuos, tanto en el grupo control como el tratamiento con PRP, presentaron una cantidad abundante de colágeno nuevo, lo que indica que hay una evolución favorable en el proceso de cicatrización de ambos grupos, sin embargo, durante la evaluación se determinó que el tratamiento no afecta estadísticamente el tiempo de cicatrización de la herida, por lo que se rechaza la hipótesis de que el PRP sea más efectivo en el tratamiento de la herida quirúrgica abdominal, evaluado de manera histológica

Cuadro2: Evolución de los grupos evaluados microscópicamente expresados en porcentaje

		Tiempos									
		Día 1		Día 3		Día 6		Día 10		Día 14	
Estados		C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Sin resolución	N	12	12	8	6	0	0	0	0	0	0
	%	100	100	66.6	50	0	0	0	0	0	0
Poco resuelto	N	0	0	4	6	12	8	0	0	0	0
	%	0	0	33.3	50	100	66.6	0	0	0	0
En proceso	N	0	0	0	0	0	4	12	3	0	0
	%	0	0	0	0	0	33.3	100	25	0	0
Avanzado	N	0	0	0	0	0	0	0	9	12	12
	%	0	0	0	0	0	0	0	75	100	100
Total	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

C: control T: tratamiento

En la tabla 2, observamos que, en el día 1, ambos grupos empiezan con heridas sin resolución, ya que hay un predominio de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos sin presencia significativa de fibroblastos y vasos sanguíneos nuevos (sin resolución). Conforme van pasando los días, los estados de las heridas van progresando, se aprecian ligeras diferencias entre ambos grupos, acentuándose la brecha entre ellas hasta el día 10, es así que se muestra que el grupo tratamiento tiene una mejora un poco más rápida durante los días 3, 6 y 10 que el grupo control. En el día 14, podemos apreciar que ambos grupos llegaron a una curación avanzada, habiendo una cantidad de moderada a abundante de fibroblastos y vasos sanguíneos nuevos y sin visualización de cantidades importantes de polimorfonucleares, linfocitos o macrófagos en su estado final (avanzado).

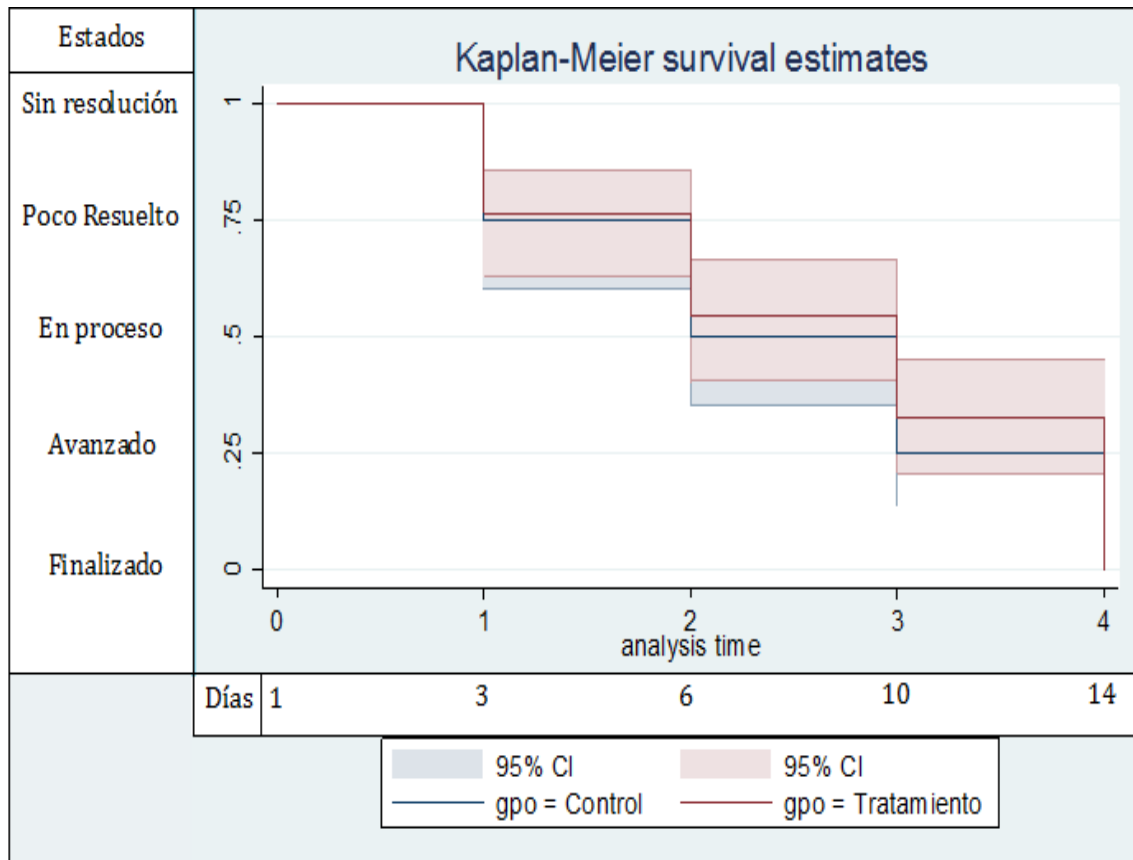


Gráfico 2: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Registro de datos del tiempo de la resolución de la herida de los individuos evaluados de manera microscópica

Mediante la metodología de análisis de supervivencia, donde el evento de análisis es resolución de la herida, se presenta la gráfica de cicatrización en función del tiempo, según grupos evaluados, grupo control y tratamiento. El gráfico 2, muestra que ambas líneas se superponen hasta el tiempo 1 de evaluación (día 3), posteriormente, en el resto del evento, se observa una ligera diferencia, la cual no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Se concluye que ambos grupos de experimentación no presentan diferencias estadísticas en la resolución de la herida.

Observamos que, en el tiempo 0, ambas líneas están unidas, conforme van pasando los días, se observa que las líneas se van separando, lo que muestra que el grupo tratamiento tiene una mejora un poco más rápida durante los tiempos 1 (día 3), 2 (día 6) y 3 (día 10). En el tiempo 4 (día 14), podemos apreciar que ambos grupos llegaron a ser iguales, por lo que se

observó que la herida no se resuelve en menos tiempo, tampoco se puede ver que, en algún momento de la evaluación, hubiera una diferencia estadística significativa entre ambos grupos, ya que, aunque se ve una resolución más efectiva por parte del grupo tratamiento en el tiempo 3 (día 10), al análisis estadístico de la prueba nos dice que esta no representa una diferencia considerable como para afirmar que el PRP hizo una diferencia en la curación de la herida. Por lo tanto, durante todo el evento el efecto del PRP no puede considerarse determinante a nivel estadístico entre el control y el tratamiento a nivel microscópico.

En el anexo 8, imagen 2, se muestra el proceso de evolución de la cicatrización a nivel microscópico.

V. DISCUSIÓN

Diversos estudios han investigado los efectos de la aceleración de la cicatrización por plasma rico en plaquetas en modelos animales y humanos en heridas agudas y crónicas. (5-15).

En este estudio, se aplicó PRP en las heridas, antes de su cierre, para evaluar si había una disminución en el tiempo de cicatrización de las heridas quirúrgicas cutáneas abdominales en los conejos. Las heridas se examinaron macroscópicamente y microscópicamente, y los resultados del control y los grupos tratados con PRP se compararon para evaluar la progresión de la cicatrización.

La evaluación en este estudio se realizó en el día 1, 3, 6, 10 y 14, después de realizar la herida quirúrgica. Para una mejor evaluación, el estudio se dividió en una evaluación macroscópica y una microscópica, donde se tomó en cuenta el tiempo en el cual los grupos llegaban a tener un correcto afrontamiento de los bordes de la herida, una piel sin edema, sin exudado y un color rosado concordante con el tono normal de la piel, al igual, en la parte microscópica, se evaluó el tiempo en el cual había cambios histológicos dados por los procesos inflamatorios y proliferativos.

Según los resultados de este estudio, las heridas tratadas con PRP mostraron curación porcentual macroscópica y microscópica más rápida en el día 3, 6 y 10 que los grupos control. Sin embargo estos resultados no fueron relevantes a nivel estadístico, datos que se contradicen con otros autores. Uno de los efectos conocidos de la aplicación de PRP es la aceleración del proceso de reparación, como explican DeRossi *et al.* (10), Correa *et al.* (54), Ostvar *et al.* (58) y Jee *et al.* (59), los cuales, a pesar de que presentaron diferentes sistemas de preparación del PRP, diferentes concentraciones de plaquetas y diferentes tipos de heridas, todos concluyeron en que el PRP tuvo un efecto positivo en la curación de la herida en sus respectivos trabajos.

Algunos autores describen en sus trabajos que el proceso inflamatorio tiende a ser más corto en heridas tratadas con PRP, esto principalmente por los efectos de los derivados plaquetarios. En nuestro estudio, encontramos que el grupo tratamiento tuvo signos asociados con la inflamación hasta el día 6, donde los signos eran leves a nivel histológico con aumento de los fibroblastos y la disminución de los macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos, mientras que, en el grupo control, se vio extendido, sin presentar estos signos en el día 10. A nivel macroscópico, los signos de la inflamación en el grupo tratamiento fueron disminuyendo para el día 6, siendo totalmente ausentes en el día 10, mientras que, para el grupo control, fue ausente solo en el día 10, sin cambios previos en el día 6, por lo que se el grupo tratamiento evidenció mejoras con mayor rapidez, sin embargo a nivel estadístico no se puede afirmar que este ocurriera. Según Rueda (2), el tiempo máximo de la inflamación debe ser hasta el día 5, sin embargo, en un estudio de este mismo autor su periodo inflamatorio se extendió hasta el día 8 y llegó a curar, de manera normal, para el fin del estudio, otros autores como Foundez (47), Zhou *et al.* (50) y Cervantes (56) describen un proceso inflamatorio con duraciones variadas, pero que no debería extenderse más allá de los ocho días en promedio, tras lo cual algunos casos evidenciaron problemas en la resolución. Nuestro estudio se contradice con trabajos como los de De Rossi *et al.* (10), Correa *et al.* (54), Ostvar *et al.* (48) y Jee *et al.* (59), en los cuales se afirma que el proceso inflamatorio fue mucho más corto, a pesar de la forma de preparación del PRP, la concentración de plaquetas y el tipo de herida.

Según la bibliografía, los cambios a nivel proliferativo se pueden dar entre el día 3 y 5, culminando el día 10, aunque en algunos casos se puede dar hasta en el día 14 (2,3). En nuestro estudio, encontramos que, tanto para el grupo control como el tratamiento, iniciaron la fase proliferativa a partir del día 3, teniendo su pico máximo de actividad en esta fase en el día 10, en la que para ambos grupos la cantidad de fibroblastos y capilares nuevos fue abundante. Estos hallazgos discrepan con los de DeRossi *et al.* (10) y Correa *et al.* (54) los cuales describen que la cantidad de fibroblastos y capilares nuevos se pudo observar desde la primera semana pero siendo más activa en el grupo tratamiento Sin embargo, autores como Ostvar *et al.* (58) menciona que, en su trabajo, los signos de la fase proliferativa como fibroblastos, vasos sanguíneos nuevos y formación de colágeno fueron iguales para

su grupo tratamiento y control, esto podría deberse a que, aunque la forma de preparar fue igual, las concentraciones de plaquetas fueron distintas.

El colágeno organizado es importante para la resolución de la herida. En este estudio, no se pudo cuantificar porque el método de tinción usado no era el apropiado aunque otros autores por otros métodos si lo han cuantificado en estudios similares al nuestro. Aun así se pudo apreciar una mejora considerable en la organización de este en todos los tratamientos a partir del día 6, siendo ampliamente superior al grupo control. Esto corrobora lo descrito por otros autores, los cuales mencionan hallazgos similares en cuanto a la organización del colágeno (10, 54, 58, 59, 62). Ellos describen que el colágeno fue notablemente mayor y mejor organizado, a partir del día 7, a pesar de que no todos los trabajos tienen el mismo tipo de procesado de las plaquetas ni la misma cantidad.

Para que un fibroblasto pueda producir colágeno, este debe recibir una orden bioquímica. Este paso es mediado por ciclooxigenasa-2, un tipo de enzima que pertenece a las prostaglandinas mediadoras de la inflamación. Es por lo tanto importante para la fase de proliferación de tejido nuevo así como la agregación plaquetaria. El introducir AINEs en los primeros días después de un traumatismo o una herida impide llegar correctamente a la fase resolutoria y una correcta regeneración tisular ya que interrumpe la vía de la ciclooxigenasas. Según Kristin *et al.* (63), en su trabajo sobre factores que afectan la cicatrización de heridas mencionan que heridas tratadas con AINE en ratas tuvieron una reducción significativa de los fibroblastos, inhibiendo así la proliferación. Por lo tanto, los resultados sugieren que el uso a corto plazo de AINEs después de la cirugía es beneficioso por su efecto analgésico, pero que en los pacientes con enfermedades crónicas, con heridas abrasivas o diabetes podrían verse más afectados por el efecto de los AINE en la inhibición de los fibroblastos. Por ello, en cicatrización por segunda intención los AINE deben usarse con precaución. En trabajos previos como el Rueda (2) se usó Ketoprofeno para el manejo post operatorio en gatas para heridas quirúrgicas por primera intención (Ovario Histerectomía) en el cual su tiempo de cicatrización fue entre 10 y 14 días, esto sin reportar complicaciones mayores como problemas en la cicatrización. Esto comparado con otros trabajos como los de Barrionuevo (1) y Cervantes (56), los cuales también trabajaron en

cicatrización de heridas por primera intención pero sin agregar AINEs que pudiera afectar el proceso de cicatrización de la herida, su tiempo de cicatrización fue entre los 10 y 12 días. En nuestro trabajo se decidió optar por el uso del meloxicam por problemas asociados a la insuficiencia del tramadol para manejar el dolor en los conejos y al ser estos dependientes del peristaltismo el uso excesivo de un opioide podría causar algún problema no asociado a la herida que finalmente repercuta en la cicatrización, esto teniendo en cuenta que en estudios previos para cicatrización por primera intención los tiempos de resolución de la herida no fueron tan distintos. A nivel macroscópico y microscópico no hubo problemas aparentes en la resolución de las heridas teniendo una ventaja porcentual la cicatrización del grupo tratamiento, sin embargo esta no llega a ser estadísticamente significativa por lo que no se puede descartar que el uso del meloxicam tuviera alguna influencia sobre la cicatrización ya que otros trabajos (10, 44, 58, 59, 62) mencionan que a nivel proliferativo encontraron patrones de cambio más evidentes en los grupos tratados con PRP lo cual difiere con nuestros hallazgos.

La forma de aplicación del Plasma Rico en Plaquetas también puede variar según la metodología de diferentes autores, Según Farghali *et al.* (42) la inyección sobre los bordes del tejido dañado produce un aumento excesivo del exudado y edema, lo que genera un ambiente húmedo ideal para promover la curación de las heridas. Esto ha sido ampliamente usado en cicatrización por segunda intención. Sin embargo otras formas de aplicación como la aplicación directa sobre los bordes de la herida o sobre toda la herida en sí también han sido descritas. En nuestro estudio usamos una aplicación directa sobre toda la herida ya que nuestro diseño era para una cicatrización por primera intención y al presentarse las características antes citadas podrían haber alterado la evaluación bajo los parámetros macroscópicos de la ficha 1, así como provocar la disidencia de los bordes. La forma de aplicación usada en nuestro trabajo fue la misma que utilizó Jee *et al.* (59), DeRossi *et al.* (10) y Barros *et al.* (62). Mientras que otros autores como Corra *et al.* (54) y Ostvar *et al.* (58) inyectaron la herida con el PRP. Todos los trabajos salvo a excepción de Barros *et al.* (62), presentaron un proceso de cicatrización estadísticamente significativo a favor del PRP y mostraron mejores características macroscópicas y microscópicas alrededor del día 21, sobre todo en la contracción de la herida. Cabe mencionar que las heridas evaluadas

presentaron una cicatrización por segunda intención a diferencia de nuestro trabajo el cual fue hecho para heridas por primera intención y no tuvimos el dato adicional de la evaluación de la contracción de la herida.

A pesar de todo esto, los resultados a la evaluación estadística muestran que no hay diferencia significativa entre los grupos estudiados, datos que concuerdan con Barros *et al.* (64) quien, a pesar de que su trabajo era distinto ya que el PRP era heterólogo y las heridas eran de segunda intención, los criterios de evaluación fueron los mismos, así, como el tiempo de evaluación. Estos resultados se contradicen con los trabajos de DeRossi *et al.* (10), Correa *et al.* (54), Ostvar *et al.* (58), Jee *et al.* (59) quienes tuvieron resultados estadísticamente significativos, sin embargo, los trabajos de Corre, Ostvar y Jee fueron en heridas, por segunda intención, en la cual la evaluación, aparte de ser macroscópica y microscópica, fue también del área de curación total de la herida por lo que la contracción de esta dio datos adicionales que nosotros no tuvimos. DeRossi *et al.* (10) fue el único de los citados que hizo un trabajo en heridas, por primera intención, y que dio resultados estadísticamente significativos, teniendo diferencias con el nuestro en cuanto al tiempo de evaluación, la preparación del PRP y una concentración de plaquetas distinta.

VI. CONCLUSIONES

1. El tiempo de cicatrización del grupo experimental, en comparación con el grupo control, no presentó diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$), por lo tanto, no podemos afirmar que el PRP disminuya el tiempo de cicatrización en heridas quirúrgicas cutáneas abdominales en un modelo animal.
2. Aunque el grupo tratamiento tuvo una mejora evidente sobre el grupo control del día 3 al 10 en la clasificación de los estados de evolución de la herida a nivel porcentual, este nunca llegó a ser relevante a nivel estadístico, por lo que aunque la apreciación visual es de una mejora ambos grupos siguen teniendo el mismo valor de curación.
3. A nivel estadístico el PRP no influyó sobre el proceso inflamatorio ni proliferativo en la evaluación microscópica ni sobre la evolución de la herida a nivel macroscópico.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) en heridas quirúrgicas abdominales en modelos animales, en diferentes concentraciones, para comparar y saber cuál es la más adecuada para el uso en estos procesos, ya que diferentes autores mencionan mejoras en diferentes circunstancias.
- Se recomienda hacer estudios, en mayor escala, en animales de experimentación que permitan obtener evidencias para su uso en la clínica diaria, ya que otros autores reportan mejoras clínicas en sus hallazgos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barrionuevo A. Evaluación del extracto etanólico de Mosquera “*Crotón Elegans*”, en concentración de 10, 20 y 30% a dosis de 2ml; en cicatrización post-quirúrgica en ovario histerectomía en caninas mestizas en el centro de gestión zonal animal de Carapungo en el distrito metropolitano . [Tesis para optar por el título de médico veterinario]. Universidad de Icatunga; 2011.65 p.
2. Rueda. R. Comparación macroscópica de tres métodos (cianocrilato, adhesivo yodoforo y sutura de nylon) para cierre primario de heridas en piel de gatas, post ovariectomía, en el distrito metropolitano de Quito [tesis para optar por el título de médico veterinario]. Universidad de Las Américas. 2016. 60 p.
3. Castellanos-Ramírez D, Gonzales Villordo D, Gracia-Bravo L. Wound management. Cir. Gen 2014; 36(2):1405-99.
4. Vadillo G. Estudio comparativo de la respuesta tisular al relleno alveolar a base de Aloe vera y *Crotón lechleri*, en Alvéolos post exodoncia en incisivos de *Cavia Porcellus*, Licenciado en Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2009.
5. Carrillo P, González A, Macías S, Pineda C. Plasma rico en plaquetas. ¿Herramienta versátil de la medicina regenerativa? Cir 2013; 81(6): 74-82.
6. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, *et al.* Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. Curr Pharm Biotechnol.2012; 13(7): 1231-56.
7. Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, Grimaldi M, Casciani CU, Spagnoli LG, Orlandi A. Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. Send to Tissue Eng Part C Methods. 2009; 15(4): 625-34
8. Abellanet I. Terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencias clínicas y bioquímicas que validan su utilización [tesis para optar por el título de médico veterinario]. Universidad Autónoma de Barcelona; 2018. 50 p.

9. Carrillo-Mora P, Gonzáles Villalva A, Macías-Hernández S, Pineda-Villaseñor C. Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa? *Cir Cir* 2013; 81 (1): 74-82
10. De Rossi R, Coelho A, Mello G, Frazílio F, Leal C, Facco G et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2009. 24(4):276-281.
11. Englert S, Estep T, Ellis-Stoll C. Postoperative Surgical Chest and Leg Incision Sites Using Platelet Gel: A Retrospective Study. *J Extra Corpor Technol*. 2008; 40(4):225-228.
12. De Hingh I, Nienhuijs S, Overdeest P, Scheele K, Everts P. Mesh fixation with autologous platelet-rich fibrin sealant in inguinal hernia repair. *Eur Surg Res*. 2009; 43(3): 306-09.
13. Gómez-Caro A, Ausin P, Boada M. Platelet rich plasma improves the healing process after airway anastomosis. *Interac Cardiovasc Thor Surg* 2012; 13(6):552-56.
14. Abrego A, Abrego E, Naves C. Modelo animal: efecto del plasma rico en plaquetas en la regeneración tisular de quemaduras de segundo grado. El Salvador: Consorcio de bibliotecas universitarias; 2012(citado 03 marzo 2016); Disponible en: <http://hdl.handle.net/10972/784>.
15. Gómez A. Plasma rico en plaquetas y el tratamiento convencional en diabéticos con úlceras en miembros inferiores. República Bolivariana de Venezuela. Médico cirujano. Universidad del Zulia. 2012.
16. Calderón J. Cierre de incisiones abdominales por medio de una línea de sutura simple y continua en caninos, Universidad de San Carlos de Guatemala. *Medico Veterinario Zootecnista*. 2004.
17. Clark R. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York. Springer Science & Business Media, 2013; 1(2):130-94
18. Eming S, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014; 6(265): 265-6.
19. LeBert DC, Huttenlocher A. Inflammation and wound repair. *Semin Immunol*. 2014; 26(4):315-20
20. Salem Z, Perez P, Hening L, Huerek P, Schultz O, Butte B, Gonzales F. Heridas Conceptos generales, *Cuad. Cir*. 2000; 14(1): 90-99.

21. Ruíz L. Efecto del Plasma rico en plaquetas en la incorporación biológica de una plastia tendionosa en un túnel óseo [Tesis para optar por el grado de Doctor]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2011. 206p.
22. Cabrerizo E. Estudio histológico de la evolución temporal de las lesiones. Cuad med forense. 2015; 21(1); 3-4.
23. Ramírez G. Fisiología de la cicatrización cutánea. RFS Revista Facultad De Salud, Colombia. 2015; 2(2): 69-78.
24. Reinke H. Wound Repair and Regeneration. Eur Surg Res. 2012; 49(1): 35–36.
25. Delavary B, Van der Veer M, Egmond M, Niessen R, Beelen R. Macrophages in skin injury and repair. ElSevier. 2011; 216(7): 753-762
26. Martin P, Leibovich G. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. Trends in cell Biology, 2005; 15(11): 599-607.
27. Han G. State-of-the-art wound healing: skin substitutes for chronic wounds. Cutis. 2014; 93(1) :13-6.
28. Balsa IM, Culp WT. Wound Care. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2015; 45(5):1049-65
29. Swaim SF, Hinkle SH, Bradley DM. Wound contraction: basic and clinical factors, Compend Cont Educ Pract. 2001; 23(1): 20-24.
30. Moya E, Moya Y. Bioestimulación facial con plasma rico en plaquetas. AMC . 2015; 19(2) :167-78 .
31. Mercandetti M, Cohen AJ. Wound Healing: Healing and Repair, 2005. Emedicine.com (citado el 6 de Abril del 2017) URL: <http://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview>
32. Broussard K y Powers J. Wound dressings: selecting the most appropriate type. Am J Clin Dermatol. 2013;14(6): 449-59.
33. Greaves N, Baguneid M, ArdeshirBayat. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. Journal of Dermatological Science. ELSEViER. 2013; 72(3): 206-217.
34. Sorg H, Tilkorn D, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. Eur Surg Res. 2017; 58(2):81-94

35. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade Z, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2016; 91(5): 614-620.
36. Guo S, Di Pietro L. Factors Affecting Wound Healing. *IADL*. 2010; 89 (3): 219-229
37. Santero MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research* 2005; 304(1):274-286.
38. Yang X, Wang J, Guo S-L, Fan K-J, Li J, Wang Y-L, *et al.* et al. miR-21 Promotes Keratinocyte Migration and Re-epithelialization During Wound Healing. *Int J Biol Sci*. 2011; 7(5). P:685–690.
39. Ormazabál V. Caracterización de medio enriquecido derivado de células madre para favorecer la recuperación tisular en un modelo animal con hiperglismia. [Tesis para optar por el título de Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología]. Chile: Universidad de Concepción, 2017. 130p.
40. Kurahashi, T., & Fujii, J. Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. *Journal of Developmental Biology*, 2015; 3(2): 57-70.
41. Pastar I, Stojadinovic O, Yin N. C, Ramirez H, Nusbaum A. G, Sawaya, A, *et al.* Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014; 3(7): 445-464.
42. Sonnemann, K. J, & Bement, W. M. Wound Repair: Toward Understanding and Integration of Single-Cell and Multicellular Wound Responses. *Annual Rev of Cell & Dev Bio*. 2011; 27(27): 237-263.
43. Hinz, B. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol*. 2006; 85(3-4): 175-181.
44. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., & de Crombrughe, B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta. *J Cell Biol*, 1987. 105(3): 1039-1045.
45. Goldman, R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*. 2004; 17(1): 24-35.
46. Xue, M., & Jackson, C. J. (). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015; 4(3): 119-136.

47. Faúndez R. Plasma rico en plaquetas (PRP) y su uso en cirugía veterinaria, hospitales veterinarios. 2010; 2(2): 144-49.
48. Rodríguez J, Palomar M y García J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial.. Rev Esp Cir Oral Maxilofac. 2012; 34 (1):8–17.
49. Mazzocca A, McCarthy M, Chowanec D, Cote M, Romeo A, Bradley J, Arciero R, Beitzel K. Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability. 2012; 94(4): 308–16.
50. Zhou Y, Wan J. PRP Treatment Efficacy for Tendinopathy: A Review of Basic Science Studies. BioMed Research International. 2016; 2016(1): 1-8.
51. Rojo A. Calculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. Animales de laboratorio. 2014; 62(1):31-3.
52. Aguilar-Barojas S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud Salud en Tabasco. 2005; 11(2):333-38.
53. Hedlung C. Cirugía del sistema tegumentario. En: Fossum T./Hedlung C. /ELSEVIER. Cirugía de Pequeños animals. Texas. ELSEVIER. 2009; 1(3): 159-259.
54. Correa L, De Rossi R, Benites de Pádua S, Jardim Pontes E, Evangelista A. Estudo comparativo entre a cola de fibrina e o plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em cães; Act Cir Bras. 2012; 27 (11):2012 – 789.
55. Gilbert T, Badylak S, Gusenoff J, Beckman E, Clower DM, Daly P, Rubin JP. Lysine-derived urethane surgical adhesive prevents seroma formation in a canine abdominoplasty model. Plast Reconstr Surg. 2008; 122(1): 95-102.
56. Cervantes DM. Efectividad del 2- Etil cianoacrilato vs sutura convencional para cierre de heridas superficiales en el servicio de urgencias pediátricas. Aguas calientes, Ags. Febrero 2016.
57. Tambella AM, Attili AR, Dupré G, *et al.* Platelet-rich plasma to treat experimentally-induced skin wounds in animals: A systematic review and meta-analysis. Hamblin M, ed. PLoS ONE. 2018;13 (1):191-93.
58. Ostvar O, Shadvar S, Yahaghi E, *et al.* Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinico-histopathologic study in rabbits. Diagnostic Pathology. 2015; 1(1): 10-85.

59. Jee C-H, Eom N-Y, Jang H-M, *et al.* Effect of autologous platelet-rich plasma application on cutaneous wound healing in dogs. *Journal of Veterinary Science.* 2016;17(1):79-87.
60. Everts P, Hoogbergen M, Weber T, Devilee R, Monftort G, de Hingh I, Is the use of Autologous Platelet-Rich Plasma Gels in Gynecologic, Cardiac, and General, Reconstructive Surgery Beneficial? *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2012; 13(1):1163-62.
61. Clemente M, Juan S, Francisco S. Farmacología de los analgésicos no opiáceos (AINEs). *Mastr del dol.* 2010. 1(3): 39-40.
62. Barros K, Nascimento B, Guastini I, Sucs E, Laposy C, Nai G *et al.* Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Act Cir Bras.* 2015. 30(3):209-15.
63. Kristen A, Rosse H. Factors That Impair Wound Healing. *J Am Coll Clin Wound Spec.* 2012; 4(4): 84–91.
64. Sarabia B. Análisis histológico del proceso de cicatrización de heridas dérmicas provocadas a cobayos (*Cavia porcellus*) en bioterio, en función del tiempo [tesis para optar por el título de médico veterinario]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2018. 80p.
65. Moreno R, Carreño M, Jimenez J, Herreros J, Vilimar A, *et al.* Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora. *Farm Hosp.* 2015. 39(3):130-136.

ANEXOS

Anexo 1.

Efectos de los factores de crecimiento plaquetario. Fuente: Fáundez, 2010.

Factor de crecimiento *	Efecto
FCDP	Activación de macrófagos e inducción de angiogénesis Quimiotaxis de fibroblastos y actividad proliferativa Estimulación de la síntesis de colágeno Estimulación de la proliferación de células óseas
FTC α	Estimulación de la actividad proliferativa de los fibroblastos Estimulación de la síntesis de colágeno tipo I Estimulación de la síntesis de fibronectina Estimulación de la formación de matriz ósea Inhibición de la formación de osteoclastos y la resorción ósea
FCTi	Quimiotáctico para fibroblastos y estimulación de la síntesis de proteínas Inducción de la proliferación y diferenciación de osteoblastos, favoreciendo la formación de hueso
FCE	Promoción de la cicatrización de heridas, estimulando la proliferación de queratinocitos y fibroblastos dérmicos
FADP	Inducción de la vascularización por estimulación de las células endoteliales
FP-4	Estimulación del influjo inicial de los neutrófilos en la herida Potente agente antiheparínico Quimiotaxis de fibroblastos
FCEn	Proliferación celular Diferenciación de células epiteliales
FCVE	Angiogénesis Estimulación de la migración y mitosis de células endoteliales Creación del lumen y fenestraciones de los vasos sanguíneos Quimiotaxis de macrófagos y granulocitos Liberación de óxido nítrico, favoreciendo la vasodilatación

Anexo 2.

Ficha 1: Evaluación cualitativa de las características macroscópicas de la herida por día.

GRUPO	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
PRESENCIA DE EXUDADO												
Ausente												
Escaso												
Moderado												
Abundante												
COLORACIÓN												
Rosado												
Rojizo												
Azulado												
Negro												
EDEMA												
Ausente												
Escaso												
Moderado												
Abundante												
BORDES												
Correcta												
Buena												
Malo												
Muy mala												

C = conejo

GRUPO= tratamiento o control

La ficha1, basada en los trabajos de Correa *et al.* (54) y Barros *et al.* (62) nos permitió evaluar de manera macroscópica el proceso de cicatrización dándole un valor a cada característica para luego ser analizadas en la curva de supervivencia de Kaplan Meier.

Anexo 3.

Ficha 2: Evaluación cuantitativa de las características microscópicas de la herida por grupo (a) y por día de muestreo (b).

a.

Conejo 1 Tratamiento					
	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Promedio
PLMN					
L					
M					
F					
C					
Conejo 1 Control					
	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Promedio
PLMN					
L					
M					
F					
C					

b.

Día1 GRUPO :													
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	Prmd
PLMN													
L													
M													
F													
C													

PLMN= Polimorfonucleares

L = Linfocitos

M = Macrófagos

F = Fibroblastos

C = Capilares

C1 = Conejo (numero de animal correspondiente)

Prmd= Promedio

GRUPO= Tratamiento o Control

Anexo 4.

Ficha 3: Conteo de células a nivel microscópico

	Tratamiento		Control	
	N= 12	%	N=12	%
Presencia de polimorfonucleares				
Ausente				
Escaso				
Moderado				
Abundante				
Presencia de linfocitos				
Ausente				
Escaso				
Moderado				
Abundante				
Presencia de macrófagos				
Ausente				
Escaso				
Moderado				
Abundante				

Presencia de fibroblastos				
Ausente				
Escasa				
Moderada				
Abundante				
Presencia de vasos nuevos				
Ausente				
Escasa				
Moderada				
Abundante				

Los resultados obtenidos del conteo de células a nivel microscópico fueron ordenados para, luego, ser expresados en porcentaje. La ficha 3 está basada en los trabajos de Farghali *et al.* (42), Correa *et al.* (54) y Barros *et al.* (62) los cuales nos permitieron ordenar los datos para su posterior análisis.

Anexo 5.

Tabla 3: Evaluación total del estado de recuperación del tejido a nivel macroscópico

Estados	Apariencia cosmética óptima de una herida por primera intención
Avanzado	Muy buen afrontamiento de los bordes de la herida sin evidencia de cicatriz, exudado ausente, coloración rosada normal para el tono de piel y edema ausente.
En proceso	Buen afrontamiento de los bordes de la herida con leve presencia de cicatriz, edema ausente, el tono de piel es rojizo ha rozado y exudado ausente.
Poco resuelto	Mal afrontamiento de la herida, coloración rojiza inflamada o negra azulada (piel en mal estado), presencia de edema en un grado moderado o escaso y exudado escaso o moderado grado.
Sin resolución	Muy mal afrontamiento de la herida, presencia de exudado escaso a abundante grado, piel rojiza inflamada a negra (piel muerta) y edema escaso a abundante grado.

La categorización de los estados de cicatrización nos permite saber el nivel alcanzado por la herida en función del tiempo. La tabla 3 está basada en el trabajo de Rueda (2), el cual nos sirvió para colocar los resultados obtenidos en un estado, asignarles un valor numérico y analizar las diferencias entre los grupos, según el análisis de supervivencia de Kaplan Meier.







Anexo 6.

Tabla 4: Evaluación total del estado de recuperación del tejido a nivel microscópico

Estados	Descripción histológica de una herida por primera intención
Avanzado	Abundante a moderada cantidad de fibroblastos y vasos sanguíneos nuevos, ausentes polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos.
En proceso	Moderada a abundante presencia de fibroblastos y vasos sanguíneos nuevos, leve a moderada cantidad de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos.
Poco resuelto	Leve a abundante cantidad de fibroblastos y vasos sanguíneos nuevos, moderada a abundante cantidad de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos.
Sin resolución	Ausente cantidad de fibroblastos y vasos sanguíneos nuevos, cantidades abundantes de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos.

La categorización de los estados de cicatrización nos permite saber el nivel alcanzado de la herida en función del tiempo. La tabla 4, basada en la clasificación de Sarabia (64), nos sirvió para colocar los resultados obtenidos en un estado, asignarles un valor numérico y analizar las diferencias entre los grupos, según el análisis de supervivencia de Kaplan Meier.

Anexo 7

Día 1	
Tratamiento	Control
	
Día 3	
Tratamiento	Control
	
Día 6	
Tratamiento	Control
	

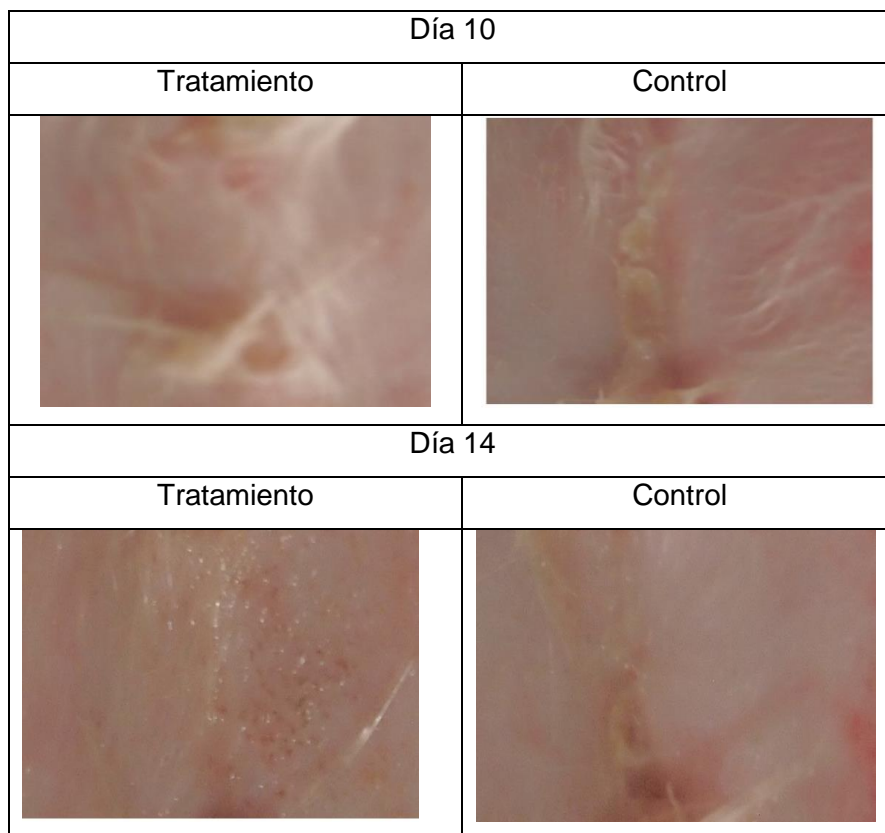
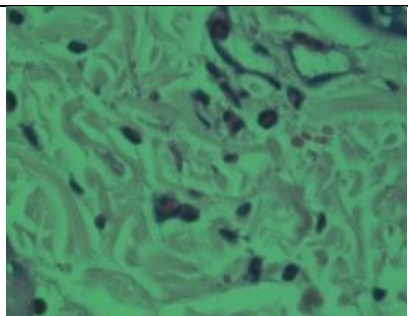
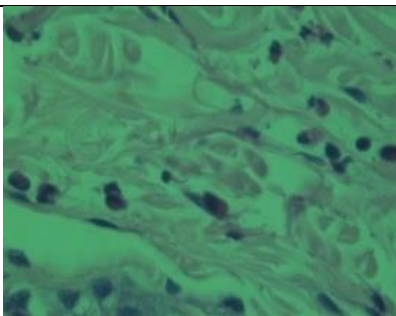
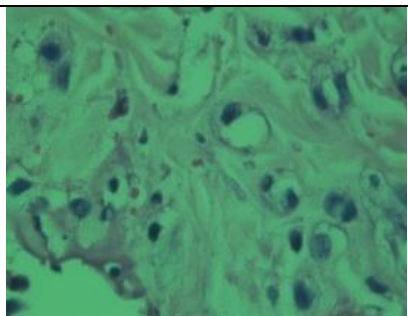
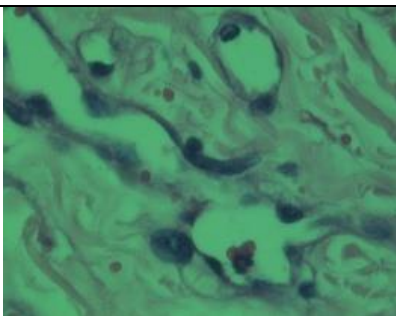
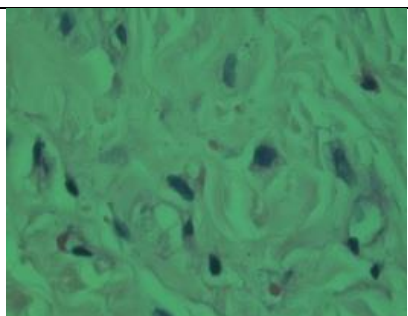
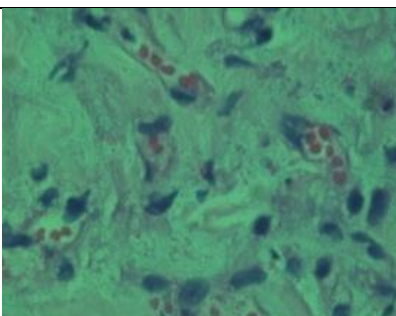


Figura 13: Evolución de las heridas a nivel macroscópico

La evidencia fotográfica del proceso de cicatrización durante los días 1, 3, 6, 10 y 14 nos permite tener registro de los cambios a nivel macroscópico. En la figura 13, podemos apreciar los cambios a lo largo de los días evaluados.

Anexo 8

Día 1	
Tratamiento	Control
	
Día 3	
Tratamiento	Control
	
Día 6	
Tratamiento	Control
	

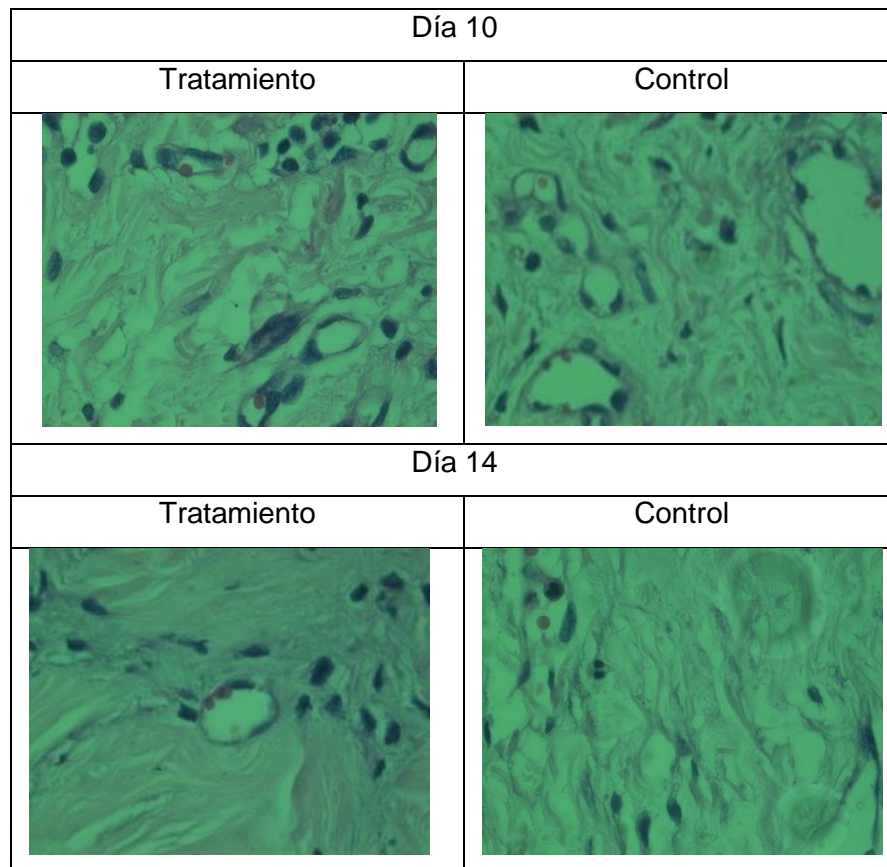


Figura 14: Evolución de las heridas a nivel microscópico

La evidencia fotográfica del proceso de cicatrización durante los días 1, 3, 6, 10 y 14 nos permite tener registro de los cambios a nivel microscópico. En la figura 14, podemos apreciar los cambios, a lo largo de los días evaluados.