

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

DERECHOS DE PUBLICACIÓN

Basados en

El Reglamento de Graduación de la Universidad Dr. José Matías Delgado

Capítulo VI, Art. 46

**“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la
Universidad para fines de divulgación”**

Publicado bajo la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual de Creative Commons
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>



Se permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra siempre que se especifique el autor y el nombre de la publicación y sin objetivos comerciales, y también se permite crear obras derivadas, siempre que sean distribuidas bajo esta misma licencia

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
"DR. LUIS EDMUNDO VÁSQUEZ"
ESCUELA DE MEDICINA



TESIS

REPRODUCCIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE ÚLCERAS ISQUEMICAS EN OREJAS DE CONEJOS

Presentado por:
BACHILLER DORA MERCEDES SANDOVAL LEWIN
BACHILLER RICARDO VELÁSQUEZ SALDAÑA

Para optar al título de:
Doctorado en Medicina

ASESOR:
DR. PABLO SALAZAR

2011

Contenido

Problema.....	1
Objetivos.....	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos	2
Justificación.....	3
Marco teórico.....	4
Anatomía de la Piel.....	4
La Epidermis	4
La Dermis.....	6
La Hipodermis (tejido celular subcutáneo)	6
Fisiopatología de las heridas.....	6
Fase inflamatoria	6
Fase de proliferación y formación de tejido	8
Fase de remodelación	12
Heridas crónicas	15
Úlceras por presión.....	15
Modelos animales de úlceras de presión/isquemia	20
Métodos de medición de úlceras	25
Generalidades sobre los conejos.....	28
Anestesia y cirugía.....	29
METODOLOGÍA	30
Tipo de estudio:	30
Universo y muestra:.....	30
Criterios de inclusión:	31
Criterios de exclusión:	31
Tipo de muestreo:	31
Definición operacional de las variables:	31
Métodos y Técnica:.....	34
Preparación de los animales:	34

Disección vascular:.....	34
Realización de las heridas	35
Análisis macroscópico:.....	35
Análisis microscópico.....	37
Procesamiento y análisis de datos.....	38
Consideraciones éticas.....	38
Resultados.....	39
Ensayo de técnica quirúrgica	39
Reproducción del modelo y Validación de método de medición	41
Pruebas de Normalidad para la validación	42
Reproducción del modelo	42
Test de normalidad de las variables	45
Resultados de pruebas paramétricas y no paramétricas.....	48
Discusión.....	51
Estudio Histopatológico	54
Reproducción del modelo de úlceras en orejas de conejo	55
Anatomía.....	55
Conclusiones	56
Recomendaciones	57
ANEXOS.....	59
ANEXO 1. Anestésicos utilizados	59
ANEXO 2. Datos obtenidos sobre Área, Longitud vertical y longitud horizontal durante el ensayo quirúrgico.....	59
ANEXO 3. Área obtenida según método de selección.....	60
ANEXO 4. Histogramas para área, longitud vertical y longitud horizontal de los grupos control y grupos isquémicos a los días 0,7 y 14.	61
A) Histogramas para áreas de úlceras	61
B) Histogramas para longitud vertical de las úlceras.....	62
C) Histogramas para áreas de úlceras.....	63
ANEXO 5. Coeficientes de forma para las áreas y longitudes iniciales (día 0) y las áreas y longitudes de cicatrización (día 7 y 14).	64
ANEXO 6. Resultado de áreas.....	65

ANEXO 7. Resultados de longitud vertical.	66
ANEXO 8. Resultados de longitud horizontal.	67
ANEXO 9. Cronograma.....	69
ANEXO 10. Materiales y Presupuesto.....	70
Bibliografía.....	72

Problema

Las úlceras de presión/isquemia han afectado a la humanidad desde hace miles de años. A pesar de los avances realizados en medicina, cirugía, tecnología, cuidados de enfermería y educación sobre los cuidados personales; aún constituye un importante problema de salud.

Todos los avances en la prevención, diagnóstico y manejo de las enfermedades han prolongado la expectativa de vida de la humanidad, por lo que cada vez se tienen personas mayores y/o con problemas crónicos que favorecen la formación de úlceras isquémicas.

Se estima que en Estados Unidos ocurren un millón de úlceras de este tipo cada año. Sin embargo, la información sobre la epidemiología y la historia natural es limitada. La incidencia de úlceras por decúbito en pacientes hospitalizados es de 2.7% - 29% y la prevalencia es de 3.5% a 69%. Los pacientes con úlceras preexistentes presentan una incidencia de úlceras por decúbito adicionales del 26%.¹ En un estudio canadiense se reporta una prevalencia del 25.1%, y en estudios alrededor de Europa del 18.1%.²

Los pacientes con predisposición a desarrollar úlceras por decúbito presentan una mayor morbi-mortalidad. La complicación más común es la infección de las úlceras y se ha reportado sepsis secundaria a osteomielitis en un 26% de las úlceras refractarias al tratamiento.¹

Existen diferentes modelos animales para investigación sobre úlceras de presión/isquemia con diferentes grados de complejidad, pero aún no se ha establecido un modelo definitivo para la investigación en este campo. En El Salvador nunca se ha reproducido un modelo experimental de úlceras isquémicas, por lo que no se puede hacer investigación acerca del manejo terapéutico.

Objetivos

Objetivo general

Reproducir un modelo experimental de úlceras isquémicas en orejas de conejos que sea factible en nuestro país y válido para la comunidad científica.

Objetivos específicos

- a) Crear úlceras en orejas de conejos, que asemejen las úlceras por isquemia en humanos.
- b) Validar un método de medición de las dimensiones de las úlceras, utilizando imágenes digitales.
- c) Documentar la evolución de las úlceras mediante imágenes obtenidas con un escáner y comparar la cicatrización de las úlceras isquémicas con las úlceras control por medio del análisis de imágenes digitales.
- d) Comprobar la cicatrización mediante el análisis histopatológico de las úlceras.

Justificación

En la actualidad se conocen los factores de riesgo para el desarrollo de úlceras por presión, los lugares anatómicos más frecuentes donde se forman, su fisiopatología e incluso, durante la última década, se ha dedicado mucho tiempo en crear protocolos para la prevención de úlceras por presión. Entre estas medidas se encuentran el uso de colchones antiescaras, cambios posturales, hidratación de la piel, etc. Pero aún con estos conocimientos la prevalencia de ellas es muy alta en hospitales y asilos.

En un estudio descriptivo realizado en el hospital universitario de la Universidad de Uppsala en Suecia, se observó que la prevalencia de úlceras por presión de todos los pacientes ingresados, exceptuando el área de psiquiatría y maternidad, en el año 2002 fue de 23.9%. Después se comenzaron a implementar medidas antiescaras y cuatro años más tarde, la prevalencia fue de 22.9%, por lo que los investigadores concluyeron que a pesar de las medidas preventivas empleadas y la existencia de un mejor conocimiento médico, no hubo disminución en su prevalencia.²

Los estudios actuales en el área de úlceras de presión/isquemia han encontrado dificultades metodológicas y para la descripción de las lesiones, por lo que se necesitan estudios en esta área, especialmente en la caracterización, prevención y tratamiento de las úlceras; con el objetivo de prevenir las complicaciones secundarias en personas con discapacidad.

Si bien es cierto, los estudios in vitro son valiosos para examinar mecanismos a nivel molecular, pero no pueden replicar las complejas condiciones que influyen sobre una herida. Entre los diferentes factores que influyen en el proceso de recuperación de una herida, y que son difíciles de reproducir in vitro, se encuentran variaciones en la temperatura, pH, circulación, tensión de oxígeno y el aporte/demanda de nutrientes. Posiblemente la característica más importante que carecen los cultivos celulares es la interacción de diferentes tipos celulares en 3 dimensiones.³

Por todo lo anterior se necesitan modelos animales que reproduzcan de manera fidedigna las úlceras por presión/isquemia, para comprender verdaderamente el proceso de recuperación de las heridas y las variaciones que ocurren en su fisiopatología; y con esto, proponer nuevas medidas preventivas y nuevos tratamientos.

“Los Modelos animales son necesarios para la comprensión de la etiología y fisiopatología de las úlceras por presión, así como también para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos”.⁴

Marco teórico

Anatomía de la Piel.

La piel está constituida por tres capas:

- 1) Epidermis, 2) Dermis y 3) Hipodermis ó tejido celular subcutáneo (Fig.1)

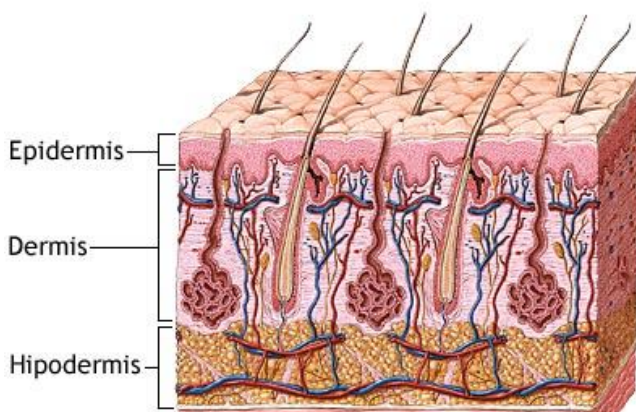


Fig. 1 Capas de la piel. Dentro de estas tres capas se encuentran estructuras importantes, como las glándulas sudoríparas, ecrinas y apocrinas, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas. También contienen vasos sanguíneos, vasos linfáticos y terminaciones nerviosas. Tomado de: Skin layers. Available at: <http://adam.about.com/encyclopedia/Skin-layers.htm>

La Epidermis

La epidermis es la parte más superficial de la piel, consta de epitelio escamoso estratificado queratinizado, con un espesor de aproximadamente 0.4-1.5mm, siendo más gruesa en aquellas zonas donde se ejerce presión o fricción, como en las palmas o plantas, y más delgada en áreas delicadas como los párpados. Los queratinocitos son las células predominantes en esta capa, intercalados entre ellas, células de Langerhans y melanocitos. Los queratinocitos son células derivadas del ectodermo, constituyen cerca del 80% de todas las células de la epidermis. Esta consta a de 4 estratos, excepto en las palmas de las manos y plantas de los pies.

Las capas epidérmicas de la más profunda a la superficie son: basal o germinativa, espinosa, granulosa y córnea (Fig 2).

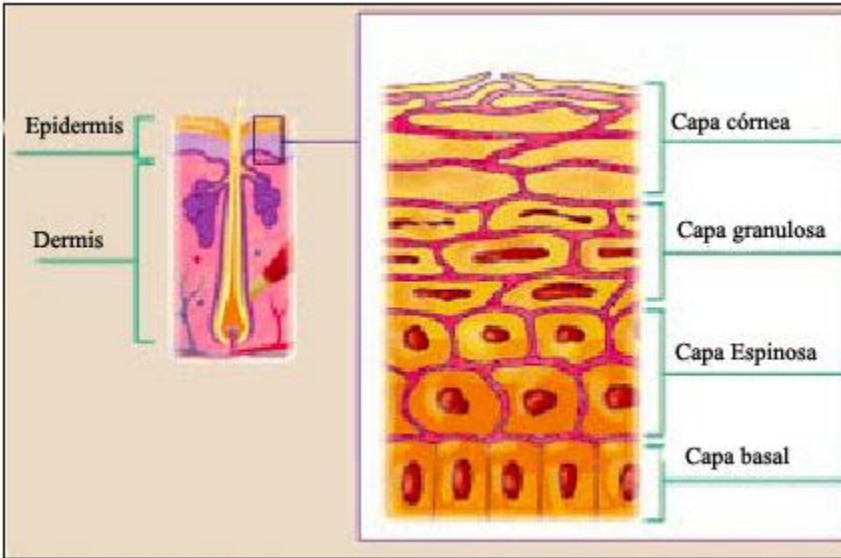


Fig. 2 Estratos celulares de la piel. Tomado de: dfarmacia.com. Available at: http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=37&id=13026484

El **estrato basal o germinativo** contiene queratinocitos mitóticamente activos que se adhieren a la membrana basal y forman las células más superficiales de la epidermis. En los humanos, el tiempo promedio que demora una célula desde que se desprende de la lámina basal hasta migrar al estrato córneo es de 14 días y de este punto a ser descamada necesita 14 días más.

El **estrato espinoso**, también llamada capa de Malpighi, está formado por células polihédricas o poligonales que se aplanan conforme migran hacia la superficie y constituye el mayor volumen de la epidermis.

El **Estrato granuloso** es necesario para el proceso de muerte celular programada y para la formación de una barrera impermeable.

Estrato córneo, en este estrato ya ha habido una completa transición de células granulares a células cornificadas. Esto crea una estructura que provee protección mecánica a la piel y forman una barrera contra la pérdida de líquidos y asimismo, protege contra la penetración de microorganismos, agentes tóxicos y sustancias solubles que se encuentran en el ambiente.

El **estrato lúcido** consiste en una zona de transición entre la capa granulosa y la capa córnea, solo presente en palmas de las manos y plantas de los pies.

La Dermis

Esta constituye la parte más voluminosa de la piel y aporta entre el 15-20% del peso total del cuerpo humano. En ella se pueden diferenciar dos regiones: 1) la dermis papilar y 2) la dermis reticular.

La dermis papilar está constituida por fibras de colágeno de pequeño calibre y fibras elásticas de oxitalan, no contiene colágeno maduro y tiene una densidad alta de fibroblastos y mayor actividad metabólica que la dermis reticular.

La dermis reticular contiene fibrillas de colágeno de mayor calibre entrelazadas con fibras de tejido elástico maduras y ramificadas que poseen mayor elasticidad y resistencia.

La Hipodermis (tejido celular subcutáneo)

La grasa subcutánea está formada por lipocitos, dispuestos en lobulillos separados por trabéculas de tejido conectivo; situada por debajo de la dermis y limitada por la fascia profunda. Posee varias funciones, entre ellas, amortiguar el trauma, servir de barrera térmica y almacenar calorías.

Fisiopatología de las heridas.

La curación de las heridas puede dividirse en tres fases: Inflamación, proliferación y maduración.⁵⁻⁷

Fase inflamatoria

La fase inflamatoria inicia inmediatamente después de una lesión aguda y lanza una serie de mecanismos y vías hemostáticas que dan los síntomas cardinales de inflamación: dolor, calor, rubor, tumor y pérdida de la función⁷.

La disrupción en los vasos sanguíneos conlleva a la liberación de células sanguíneas y diferentes sustancias transportadas en la sangre que dan como resultado la formación de un coágulo. La porción del coágulo dentro de la luz del vaso provee hemostasia y la porción en el interior de la herida sirve como matriz provisional para la migración celular⁵.

Esta primera etapa de la fisiopatología de las heridas se divide en 3 componentes: 1) liberación y agregación plaquetaria, 2) el proceso de coagulación e inflamación y 3) reclutamiento de leucocitos.

Liberación y agregación plaquetaria

La lesión tisular produce lesión vascular, liberación plaquetaria y activa la cascada de la coagulación⁵. La fibrina resultante logra la coagulación, ayudada por la vasoconstricción y sirve como una guía para la agregación plaquetaria⁸. Las plaquetas en el sitio de la lesión entran en contacto con la trombina y colágeno fibrilar, los cuales disparan su activación, adhesión y agregación⁵.

El proceso de coagulación e inflamación

Durante el proceso de coagulación, el plasma y otros elementos sanguíneos se fugan de los vasos sanguíneos y contribuyen a la formación de trombos a través de la vía intrínseca y extrínseca de la cascada de coagulación. Estas dos vías aunque son activadas por factores diferentes, ambas conllevan a la formación de trombina y finalmente de fibrina. La estabilidad de la fibrina y su actividad biológica depende del entrecruzamiento de sus fibras⁵.

La migración al sitio de lesión de varias células clave, como queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales y monocitos es ayudada por sus receptores para varios componentes del trombo. Sin embargo, una multitud de mediadores son producidos y juegan un papel importante en la amplificación de la fase de inflamación/coagulación. El resultado de la acción de estos mediadores es el aumento de la permeabilidad capilar, reclutamiento de monocitos y neutrófilos y la liberación de factores de los mastocitos.

Reclutamiento de leucocitos.

Durante las etapas tempranas de la cicatrización de las heridas existe una cascada constante de moléculas inflamatorias y reclutamiento de células inflamatorias. Los neutrófilos y los monocitos llegan al sitio de la lesión casi al mismo tiempo. Inicialmente, los neutrófilos están presentes en mayor cantidad porque constituyen una porción más grande de las células sanguíneas. Tanto los neutrófilos como los monocitos son atraídos al sitio de la lesión por factores quimiotácticos como calicreína y fibrinopéptidos liberados del fibrinógeno, y productos de la degradación de la fibrina. Es importante comprender que para poder entrar en la herida, los leucocitos deben dejar la circulación, un proceso que es altamente regulado por cambios moleculares en la superficie de las células endoteliales de los

vasos sanguíneos, dentro y cerca de la herida. Esta interacción endotelio/leucocitos provee los medios para seleccionar los tipos de leucocitos que entran al sitio de lesión. En respuesta a la lesión, las células endoteliales expresan selectinas que, gracias a sus propiedades adhesivas, hacen que los leucocitos se desplacen más lento y sean extraídos del torrente sanguíneo. Una vez estas adhesiones débiles frenan los leucocitos, las adhesiones interactivas más fuertes brindadas por las integrinas β -2 hacen que los leucocitos negocien el espacio entre las células endoteliales y alcancen la herida⁵.

Los neutrófilos son importantes en el debridamiento tisular y la muerte bacteriana, eventos que producen más productos de la activación del complemento con propiedades inflamatorias y quimiotácticos. Sin embargo, los neutrófilos no parecen ser absolutamente esenciales en la cicatrización de las heridas, ya que la neutropenia no interfiere con la cicatrización⁵.

Después de 24-48 hrs de la lesión los monocitos reemplazan a los neutrófilos, convirtiéndose en los leucocitos predominantes y experimentan un cambio fenotípico hacia macrófagos tisulares. A diferencia de los neutrófilos, estos son esenciales para la progresión de la cicatrización. Los macrófagos fagocitan, matan bacterias y eliminan los desechos tisulares. Además, también liberan diferentes factores de crecimiento, incluyendo al factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de transformación tisular beta y alfa (TGF- β y TGF- α); estimulando con esto la migración y proliferación de los fibroblastos, así como la producción y modulación de la matriz extracelular. Se ha establecido que los macrófagos son las células centrales y críticas para la reparación de las heridas. Esto se basa en que experimentos con animales depletados de macrófagos con el uso de suero antimacrófagos y esteroides no cicatrizan adecuadamente⁵.

Unos días después de la lesión, los neutrófilos remanentes son fagocitados por los macrófagos tisulares, y la primera fase de la reparación de las heridas llega a su fin^{5,6}.

Fase de proliferación y formación de tejido

La primera fase de la cicatrización de las heridas es la base para la fase de proliferación y formación de tejido. La agregación y liberación plaquetaria, el proceso inflamatorio temprano y la entrada a la herida de neutrófilos y, subsecuentemente, monocitos-macrófagos, han desarrollado diferentes funciones que ahora permitirán y facilitarán la proliferación de células claves residentes, como fibroblastos, migración de células endoteliales y el proceso de neovascularización y migración de queratinocitos. Los queratinocitos migran a la cama de la herida, liberan proteínas y enzimas que facilitan su migración y finalmente, reconstituyen la epidermis dañada y la membrana basal. Las etapas subsecuentes de la

segunda fase de cicatrización, incluye la formación de tejido de granulación y reconstitución de la matriz dérmica (fibroplasia) y el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).

Los fibroblastos rápidamente se convierten en las células predominantes alcanzando su pico entre la 1ª y 2ª semana. Estos generan no solo colágeno, si no también diferentes citoquinas como PDGF, TGF-B, bFGF, factor de crecimiento del queratinocito y factor de crecimiento parecido a la insulina 1. Los fibroblastos también ensamblan las moléculas de colágeno en fibras, el cual es el principal componente del tejido conectivo de las heridas en fase aguda y, el incremento de su contenido en la herida se correlaciona con la fuerza tensil⁹. El colágeno tipo III es el predominante en la fase temprana de la cicatrización y alcanza su concentración máxima 5-7 días después de la injuria⁵.

Los fibroblastos y las células endoteliales sufren activación, alteración fenotípica y migración⁵. Después de 2-3 días de producida la lesión los fibroblastos migran al interior de la herida desde la matriz fibrinosa del coágulo, establecida durante la fase inflamatoria. Durante la primera semana los fibroblastos producen glicosaminoglicanos y proteoglicanos, que constituyen la base para el tejido de granulación; así como también colágeno tipo I y III⁹, en respuesta al bFGF, TGF-B y PDGF.

Otro componente crítico en esta fase es la hipoxia tisular, que inicia inmediatamente después de la lesión y cuyos efectos tienen un profundo impacto en la migración y proliferación de los fibroblastos y células endoteliales, así como posiblemente, en la migración de los queratinocitos.

Para una mejor comprensión de la segunda fase de la cicatrización se discutirá en 6 eventos: 1) hipoxia, 2) fibroplasia, 3) angiogénesis, 4) migración de queratinocitos 5) producción de la matriz extracelular y 6) el rol de las integrinas.

Hipoxia

Inmediatamente después de la lesión, la herida se vuelve hipóxica debido a la constricción de los vasos sanguíneos. Es importante tener claro que hipoxia es diferente a isquemia. Esta última implica que tanto el flujo sanguíneo como el aporte de oxígeno estén alterados.

Los niveles de tensión de oxígeno bajos son un estímulo temprano muy importante para la activación de los fibroblastos y células endoteliales. Además, la replicación y longevidad de los fibroblastos son amplificados por la hipoxia y los niveles de tensión de oxígeno bajos estimulan la expansión clonal de los fibroblastos dérmicos. Más aún, la síntesis de un gran número de factores de crecimiento es amplificado

por las células hipóxicas y los macrófagos secretan una sustancia angiogénica únicamente cuando están expuestos a niveles de tensión de oxígeno bajos.⁵

Fibroplasia

Durante el proceso de reepitelialización la lesión experimenta fibroplasias y angiogénesis. El término fibroplasia se refiere a la formación de tejido de granulación y la reconstrucción de la matriz dérmica. Las células clave para esto son los fibroblastos, los cuales migran al interior de la herida, producen grandes cantidades de colágeno, proteoglicanos, elastina y otros componentes de la matriz; y participan en la contracción de la herida.

Los fibroblastos comienzan a migrar dentro de la herida 48 hrs después de la lesión. Estos se desplazan entre las fibras de la matriz de fibrina-fibronectina depositada en el coágulo, y producen fibronectina por su propia cuenta.

Además, los fibroblastos producen otros componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno tipo I y III, elastina, glicosaminoglicanos y proteoglicanos. El colágeno tipo III es el tipo de colágeno predominante durante las etapas tempranas de la cicatrización.

A medida se forma nuevo tejido conectivo, algunos fibroblastos experimentan cambios fenotípicos posteriores, hacia miofibroblastos ricos en actina y en retículo endoplasmático, necesario para la formación de grandes cantidades de proteínas para formar la matriz. Estas células presentan características propias de los fibroblastos y de las células de músculo liso. Los miofibroblastos son responsables, en gran medida, de la contracción de las heridas y están predominantemente presentes en el tejido de granulación. El Grado de contracción de la herida depende, en gran medida, de la profundidad de la lesión. Estas pueden ser de espesor parcial o total. En las lesiones de espesor total, la lesión se extiende hasta los anexos. Estas lesiones sanan, al menos en parte, por contracción, que resulta en una disminución de, aproximadamente, el 40%, del tamaño de la herida. En estas lesiones de espesor completo, la epitelización ocurre, únicamente, desde el borde de la lesión. Las heridas de espesor parcial no son tan profundas y parte de los anexos permanecen en el lecho de la herida. Estas presentan menos contracción y la epitelización ocurre desde el borde de la herida y desde las estructuras anexas al lecho de la lesión⁵.

Angiogénesis

La angiogénesis describe el proceso en el cual se forman nuevos vasos sanguíneos, llamado neovascularización. La angiogénesis ocurre al mismo tiempo que la fibroplasia y, de hecho, ambas son independientes. De la misma forma que con otros procesos de la cicatrización, la formación de los vasos sanguíneos ocurre en el contexto de los cambios que experimenta la matriz extracelular. La célula clave en la angiogénesis es la célula endotelial que, como los queratinocitos y los fibroblastos, debe cursar cambios específicos para migrar al lecho de la herida, proliferar y dirigir la formación de nuevos vasos sanguíneos. La migración de las células endoteliales a la herida depende de las señales quimiotácticas enviadas por la matriz extracelular y las células vecinas. Existe evidencia que en la angiogénesis, así como en la reepitelización, la migración celular es un componente más importante que la proliferación⁵.

Un gran número de factores han sido implicados en la estimulación de la angiogénesis. Bajos niveles de oxígeno, en las etapas tempranas de la lesión, potencian la angiogénesis y la fibroplasia y podrían estimular la producción y secreción de factores angiogénicos por los macrófagos.

Migración de los queratinocitos

El proceso de reepitelización comienza varias horas después de la lesión tisular. La migración de los queratinocitos es la responsable de la mayor parte de la reparación de la superficie epidérmica. El proceso de reepitelización es diferente en las heridas agudas que en aquellas en las que se dificulta la cicatrización. Uno o dos días después de la lesión inicial, las células epidérmicas en el borde de la herida y dentro de ella, comienzan a proliferar, contribuyendo a la población de células migrantes. Para heridas pequeñas, el evento proliferativo es menor y probablemente no tan importante. Sin embargo, en heridas grandes existe una gran actividad proliferativa, sin la cual, la oportuna y adecuada reparación de la herida no ocurriría.

La laminina es un componente importante de la zona de la lámina lucida en la membrana basal. En la piel intacta, esta glicoproteína actúa previniendo el contacto directo entre los queratinocitos y el colágeno dentro de la membrana basal (IV y VII) y la dermis (tipo I, III y VI). Con la lesión de la piel, el componente de la lámina se rompe y permite el contacto de los queratinocitos con el colágeno subyacente, estimulando la migración. Se ha visto que la laminina reaparece en la unión dermo-epidérmica después que los queratinocitos han migrado y reparado la herida, sirviendo como una señal para que estos detengan su migración.

Existen otras enzimas importantes en el proceso de reepitelización como las metaloproteinasas (MMP). Estas son endopeptidasas dependientes de zinc que son activadas por otras proteinasas como la plasmina, y que son bloqueadas por inhibidores tisulares de las metaloproteinasas. La colagenasa-1 (MMP-1), estromelisin-2 (MMP-10) y la gelatinasa-92kd (MMP-9) son expresadas por los queratinocitos en el borde de la herida. MMP-1 es necesaria para la migración de los queratinocitos sobre el colágeno tipo I y recibe retroalimentación positiva en el borde de la herida, después que las células se han liberado ellas mismas de la lamina basal. La MMP-10 degrada un gran número de proteínas de la matriz extracelular diferentes al colágeno. Otras MMPs reciben retroalimentación positiva solo por los bordes proximales de la herida. En esta categoría se encuentra la estromelisin-2 (MMP-10) y la epilisin (MMP28), que se asocia a la proliferación de los queratinocitos.

Fase de remodelación

En la tercera y última etapa de la cicatrización, el tejido formado es degradado y remodelado y las células experimentan apoptosis y otros cambios drásticos. Típicamente, esta fase puede durar varios meses. A pesar que el resultado funcional no es el ideal, el proceso de remodelación permite obtener una cicatriz con el 70% de su fuerza original. El proceso de remodelación es necesario para la retroalimentación negativa y regresar a una aproximación del estado previo a la lesión.

Los eventos de la remodelación están estrechamente unidos a aquellos que han permitido la deposición de ciertos componentes de la matriz extracelular y la migración de las células a la herida. La razón de esto es que la remodelación no puede llevarse a cabo mientras las señales estimuladoras no sean "apagadas". Es necesario recordar que la fase de remodelación no ocurre homogéneamente dentro de la herida, ni en tiempo ni lugar.

Fibronectina y componentes asociados.

Los fibroblastos producen fibronectina mientras entran al sitio de lesión y, al menos inicialmente, las concentraciones de fibronectina son muy elevadas. Entre el 4º y 5º día después de la lesión, la red de fibronectina se encuentra bien establecida.

Existe direccionalidad en la deposición de la fibronectina, lo cual es importante en la forma como otras proteínas de la matriz extracelular se posicionan. Por ejemplo, la deposición de colágeno se alineará en relación al patrón de deposición de la fibronectina, que refleja el eje de alineación de los fibroblastos.

Por último, durante la remodelación y la contracción, los miofibroblastos usarán la fibronectina para la contracción de la herida.

Acido hialurónico y proteoglicanos

Los fibroblastos del tejido de granulación temprano producen grandes cantidades de acido hialurónico glicosaminoglicano (GAG) y las células proliferantes expresan el CD44, el cual es un receptor para la molécula de GAG. Desde el punto de vista físico/espacial, el acido hialurónico crea una estructura altamente hidratada que conlleva a la inflamación del tejido y los espacios intersticiales y, por lo tanto, un ambiente más conductivo para el movimiento celular⁵.

Eventualmente, mientras la remodelación ocurre, el acido hialurónico es degradado por las hialuronidasas y es reemplazado por los proteoglicanos, los cuales contribuyen con un rol estructural más poderoso en la formación del tejido de granulación tardío y en la cicatrices, mientras son menos capaces de estimular el movimiento celular.

Colágeno

Los tipos principales de colágeno están presentes normalmente en el tejido conectivo son: colágeno fibrilar (tipo I, III y V), colágeno de la membrana basal (tipo IV) y otros colágenos intersticiales (VI, VII y VIII). El colágeno fibrilar sirve como el colágeno estructural más importante del tejido conectivo.

Durante las fases iniciales de la cicatrización, parece que la herida tiende a repetir el proceso involucrado en la embriogénesis. Este tejido de granulación es inicialmente compuesto de grandes cantidades de colágeno tipo II, el cual es un componente menor en la dermis de los adultos y de hecho está presente en mayores cantidades en la cicatrización fetal. Durante la fase de remodelación, después de un periodo de un año o más, el colágeno tipo III es gradualmente reemplazado por colágeno tipo I. Este reemplazo está asociado con un incremento de la fuerza ténsil de la cicatriz. Sin embargo, la fuerza ténsil de la cicatriz es solamente un 70% de la fuerza ténsil de la piel previo a la lesión. El proceso de convertir el contenido de colágeno de la dermis de tipo III a tipo I es controlado por la interacción de la síntesis de nuevo colágeno con la lisis del antiguo colágeno. La clave para este proceso de conversión son las metaloproteinasas y específicamente las colagenasas.

La fase de remodelación es más que la degradación del exceso de moléculas formadas durante la fase proliferativa. Durante esta etapa las células regresan a un fenotipo estable, los materiales de la matriz extracelular son alterados y el tejido de granulación, que fue tan exuberante durante las etapas tempranas de la cicatrización, desaparece.

Miofibroblastos y la contracción

Durante las etapas más tempranas de la cicatrización se forma nuevo tejido de granulación, comenzando alrededor de 4 días después de la lesión. El tejido de granulación recibe su nombre por su apariencia granular, que es rico en estructuras vasculares. En la herida madura y durante la remodelación, este tejido de granulación debe ser modificado. Uno de los eventos primarios es la contracción de la herida.

Existen diferentes grados de contracción, dependiendo del huésped, la ubicación de la herida y su profundidad. Por ejemplo, los roedores sanan en gran parte por contracción¹⁰, que debe ser tomado en cuenta cuando se extrapolen a humanos los resultados de estudios experimentales. La ubicación de la herida es también importante, ya que parece haber mayor contracción sobre superficies redondas, como los hombros y la nariz. Sin embargo, el factor de mayor importancia para el desarrollo y extensión de la contracción es la profundidad de la herida. Las heridas de espesor parcial incluyen únicamente la dermis papilar y sanan con menos cicatrización y contracción. Las heridas de espesor total, que incluyen la grasa y el tejido celular subcutáneo, tienden a sanar con mayor cicatriz y dependen de la contracción para la rápida reparación. De cualquier manera, la masa de tejido que se formó en las fases anteriores de la reparación de las heridas debe ser reducida, y la contracción es un medio efectivo y confiable para lograrlo. El miofibroblasto juega un rol crítico en el proceso de la contracción. Generalmente se cree que los miofibroblastos son fibroblastos “transformados” que expresan actina y que son células parecidas a las del músculo liso. El término transformados es incorrecto, ya que la transformación se usa adecuadamente solo en el contexto del paso a neoplasia. Se sabe que los fibroblastos juegan un rol fundamental en la patogenia de ciertas condiciones fibróticas, como la contractura de Dupuytren, y tienen consecuencias críticas para la expresión clínica de ciertas otras condiciones. Por ejemplo, las heridas hipertróficas son ricas en miofibroblastos y por ende se contraen y eventualmente resuelven con el tiempo. En contraste, los queloides generalmente carecen de un componente de miofibroblastos significativo y por tanto ni se contraen ni resuelven fácilmente⁵.

Heridas crónicas

Según el diccionario Webster's de la Universidad de New Riverside, úlcera se define como una lesión inflamatoria, a menudo supurativa, en la piel o superficie mucosa del cuerpo, que lleva a necrosis tisular. Según el diccionario Mosby de medicina y ciencias de la salud, úlcera se define como una lesión circunscrita como un cráter, de la piel o de las mucosas, producida por la necrosis asociada a algunos procesos inflamatorios, infecciosos o malignos¹¹. Entre las más comunes encontramos las úlceras por pie diabético, úlceras por presión y por estasis venosa.

Úlceras por presión

El Grupo Americano de Úlceras por Presión y el Grupo Europeo de Úlceras por Presión (NPUAP-EPUAP) la define como una lesión localizada en la piel y/o tejido subyacente, por lo general sobre una prominencia ósea, como resultado de presión o una combinación de presión y cizalla¹². Además, existen factores mecánicos y fisiológicos que influyen en el desarrollo de estas. Entre los factores mecánicos encontramos la presión prolongada, presión de interface, cizallamiento y fricción¹³.

La isquemia tisular es directamente proporcional al tiempo en el cual el tejido se ve sometido a la presión. Al exceder la presión capilar tisular se priva de oxígeno y nutrientes a los tejidos y se produce isquemia e hipoxia; que posteriormente causa ulceración y necrosis. Además, esta presión impide la remoción de metabólicos tóxicos, como los radicales libres, por la obstrucción de las vénulas¹³.

La presión de interfase, que se define como la fuerza perpendicular por unidad de área entre el cuerpo y la superficie de soporte¹³, permanece como un factor ambiguo en el desarrollo de las úlceras por presión. Se cree que esta se ve afectada por la composición, tensión y forma geométrica del cuerpo sostenido. Se dice que una presión de interfase mayor a 32mmHg llevan al cierre de los capilares e isquemia tisular. Una teoría establece que la presión que vence la presión capilar conlleva a una lesión de isquemia-reperfusión en el músculo, que posteriormente se ulcera¹³. Existen ciertos tejidos, como el músculo, que son más sensibles a la hipoxia que la epidermis, por lo cual pueden presentar injurias antes que se manifiesten signos clínicos de daño a la piel.

En 1959, Kosiak estableció la importancia de la presión y el tiempo de exposición a esta. Determinó que las presiones provocan necrosis tisular en poco tiempo y que las bajas presiones necesitan un tiempo de

exposición mucho mayor. Además, Comprobó que una presión de 70 mm Hg durante dos horas podía provocar lesiones isquémicas en todos los tejidos¹⁴.

La presión capilar normal oscila entre 16 y 32 mm Hg, lo que significa que presiones por encima de 16 mm Hg pueden producir un colapso de la red capilar. La isquemia local aumenta la permeabilidad capilar con la consiguiente vasodilatación, extravasación de líquidos e infiltración celular, produciéndose un proceso inflamatorio que origina una hiperemia reactiva manifestada por un eritema cutáneo. Este es reversible si, al retirar la presión desaparece en 30 minutos, restableciéndose la perfusión de los tejidos. Si no desaparece la presión, se produce isquemia local, trombosis venosa y alteraciones degenerativas que desembocan en necrosis y ulceración¹⁴.

El cizallamiento es un estrés mecánico dirigido paralelamente al plano de interés. Esto es especialmente importante en las úlceras sacras. Aunque no existe evidencia clínica, es lógico concluir que la fuerza angular y vertical que ejerce el cuerpo en posición semierguida en la cama tiende a distorsionar los tejidos y vasos sanguíneos cerca del sacro¹³.

La fricción es la fuerza de dos superficies moviéndose a través de cada una. Esto es importante en los pacientes que al movilizarlos en la cama se friccionan contra la superficie de esta, produciendo edema macro y microscópico. La humedad, maceración y la destrucción del tejido aumentan la superficie de tensión entre el tejido y la superficie de soporte. La humedad por pérdidas sensibles de líquidos corporales o incontinencia fecal o urinaria, conlleva a la maceración de los tejidos, la cual los vuelve más susceptibles al daño por presión, cizallamiento y fricción^{13,14}.

La inmovilidad es uno de los factores extrínsecos mayormente asociados con la formación de úlceras por presión. Los pacientes inmovilizados en cama tienden a desarrollar úlceras por presión en el occipucio, sacro, talones, maléolos y regiones trocántericas; mientras que los pacientes que usan sillas de ruedas para moverse, tienden a desarrollar úlceras sobre la tuberosidad isquiática¹³.

En los pacientes que se encuentran paralizados, que presentan compromiso neurológico o que fueron sometidos a periodos de sedación o anestesia prolongados; los nervios aferentes no son capaces de completar el sistema de retroalimentación sensitivo-motor. Como resultado, las advertencias tempranas

de isquemia prolongada, como discomfort, no producen los ajustes normales en la posición corporal, que intermitentemente alivian la presión en las áreas de riesgo. Estos ajustes ocurren instintivamente en las personas que no presentan afectación neurológica, incluso durante el sueño, cuando se presentan cambios de posición cada 15 minutos¹³.

En los pacientes quirúrgicos, la duración de la inmovilidad es mucho más larga que la duración de la cirugía, debido a que los pacientes están inmóviles durante el periodo preoperatorio y se mantienen así hasta que son trasladados a la sala de recuperación. Se ha encontrado que la probabilidad de desarrollar úlceras por presión se duplica en cirugías con duración más de 4 horas¹³.

Los factores fisiopatológicos que influyen en el desarrollo de úlceras por presión son: edad, fiebre, infección, isquemia, hipoxia, hipotensión, desnutrición, lesión de medula espinal, desorden neurológico, disminución del índice de masa corporal, el incremento de las demandas metabólicas, edema local, anemia, insuficiencia arterial y uso crónico de esteroides.^{4,15}

Aproximadamente el 70% de todas las úlceras por presión ocurren en la población geriátrica debido a la disminución del contenido de agua de la piel, disminución de la fuerza tensil y pérdida de la unión funcional entre la dermis y la epidermis. Por otra parte, se presenta una atrofia de las glándulas apocrinas y sebáceas disminuyen la hidratación de la piel¹⁶.

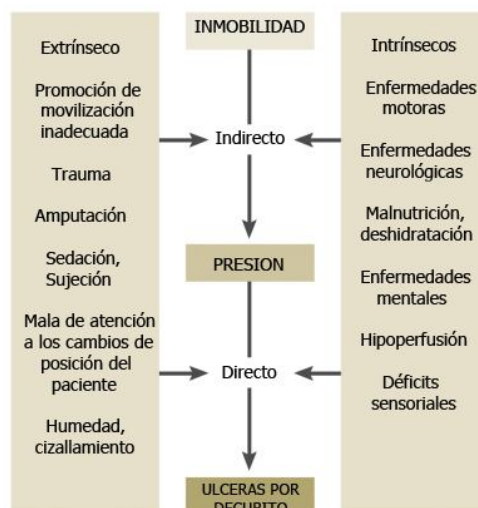


Fig. 3 Fisiopatología de úlceras por presión. En el esquema anterior se pueden observar algunos factores tanto intrínsecos como extrínsecos que contribuyen al desarrollo de úlceras por presión. Modificado de Decubitus ulcers: Pathophysiology and primary prevention¹⁷

Sistema de clasificación de úlceras

Muchos sistemas de clasificación han sido presentados en la literatura, pero el más ampliamente aceptado es el Sistema de clasificación del Grupo Europeo de Úlceras por Presión (EPUAP) y el Grupo Americano de Úlceras por Presión (NPUAP), actualizado en el año 2009¹². Este sistema consiste en cuatro categorías de las úlceras por presión, pero no pretende establecer que todas las úlceras lleven una progresión establecida de una categoría a otra; ni presentan una regresión de una categoría mayor a una menor. El sistema está diseñado para describir la úlcera en el momento de examinarla, con el propósito de mejorar la comunicación entre las diferentes disciplinas involucradas el diagnóstico y manejo.

Categoría I: Eritema no blanqueable

Representa la piel intacta con signos de ulceración inminente. Inicialmente consiste en eritema que blanquea por la hiperemia reactiva que debe resolver en 24 horas si la presión se libera (figura4.). La presión continua conlleva a eritema que no blanquea con la presión, que constituye el primer signo de destrucción tisular. La piel oscura pigmentada puede no tener palidez visible; su color puede diferir de la piel de los alrededores o puede ser dolorosa, firme, suave, más caliente o más fría en comparación a los tejidos subyacentes. Es importante detectar estos pacientes, ya que puede indicar que son personas en riesgo de formar úlceras profundas.

Categoría II: Úlcera de espesor parcial

Pérdida parcial del espesor de la piel que afecta la epidermis y posiblemente la dermis (Figura4.). Se presenta como una úlcera abierta poco profunda con un lecho de la herida rojo-rosado, sin esfacelos. También se puede presentar como una flictena o blíster intacto lleno de suero o abierta/rota.

Categoría III: Pérdida total del grosor de la piel

Pérdida total del espesor de la piel que afecta el tejido celular subcutáneo pero respeta la fascia (Figura4.). Los huesos, tendones o músculos no están expuestos. Puede encontrarse esfacelación, cavitaciones y tunelizaciones. Se debe tomar en cuenta que la profundidad de las úlceras categoría III dependen de la ubicación anatómica. Por ejemplo, el puente de la nariz, la oreja, el occipital y el maléolo no tienen tejido adiposo, por lo que pueden observarse poco profundas; en cambio en zonas donde exista abundante tejido adiposo pueden observarse extremadamente profundas.

Categoría IV: Pérdida total del espesor de los tejidos

Pérdida total del espesor de la piel y el tejido celular subcutáneo con extensión al músculo, hueso, o tendones (Figura4.). Estas pueden extenderse a estructuras de soporte, como la fascia, tendones o cápsulas articulares. Puede presentarse con osteomielitis, destrucción ósea, dislocación o fracturas patológicas.

Inestable/sin clasificar: Pérdida total del espesor de la piel o los tejidos - Profundidad desconocida

Existe pérdida del espesor total de los tejidos, pero la profundidad de la úlcera no puede ser evaluada con claridad por que se encuentre completamente oscurecida por esfacelos (amarillos, canela, grises, verdes o marrones) y/o escaras en el lecho de la herida (Fig4.). Estas deben ser clasificadas como Categoría III o IV.

Sospecha de lesión de tejidos profundos – Profundidad desconocida

Son áreas localizadas de color púrpura o marrón de piel decolorada o ampollas llenas de sangre debido al daño de los tejidos blandos subyacentes por la presión y/o cizalla. La evolución puede incluir una ampolla fina sobre un lecho de la herida oscuro, luego convertirse en una escara delgada. Puede evolucionar rápidamente y exponer capas adicionales de tejido, incluso con tratamiento óptimo.

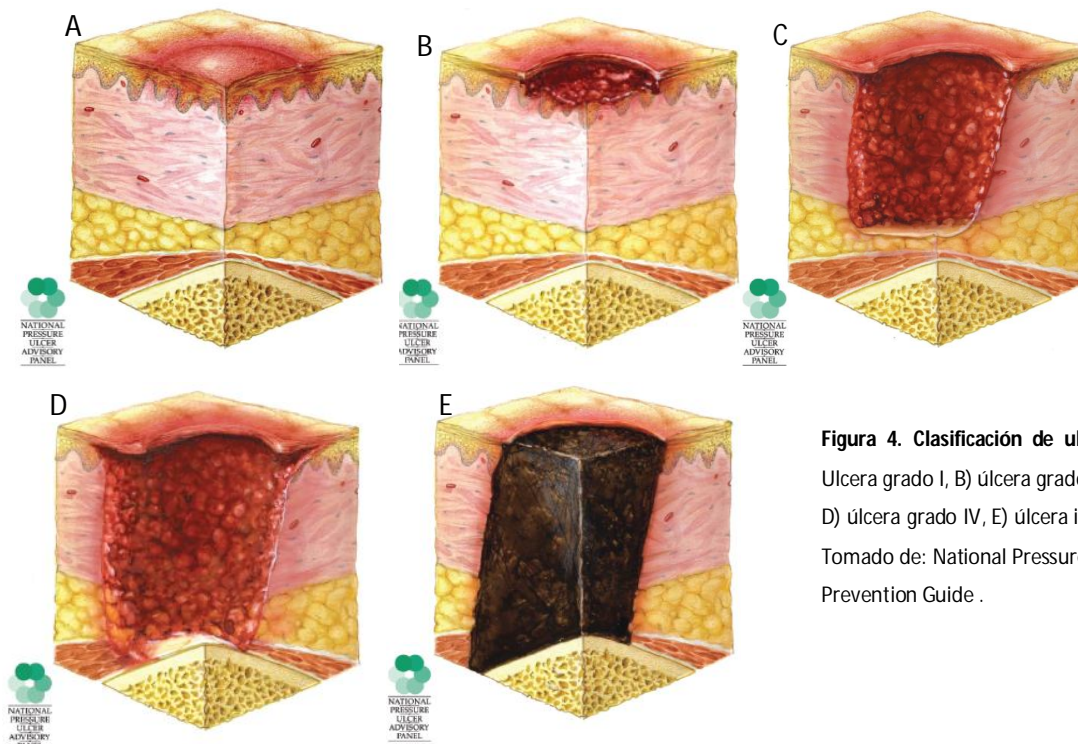


Figura 4. Clasificación de úlceras por presión. A) Úlcera grado I, B) úlcera grado II, C) úlcera grado III, D) úlcera grado IV, E) úlcera inestable/ sin clasificar. Tomado de: National Pressure Ulcer Advisory Panel. Prevention Guide .

Generalmente ocurren en pacientes paralizados o inconscientes que no pueden percibir sensaciones o responder a la necesidad del reposicionamiento periódico². En el humano el 67% de todas las úlceras por decúbito ocurren en la cadera y la región glútea, siendo la tuberosidad isquiática, región trocantérica y la sacra las más afectadas. Las extremidades inferiores constituyen el 25% de las úlceras por presión y el 10% restante ocurren en cualquier parte del cuerpo que experimente presión ininterrumpida^{9,1}.

Los hallazgos microscópicos de tejidos obtenidos de las úlceras dependen del estadio en que se encuentren y el tiempo de evolución. Cuando se observa eritema blanqueable se observan anomalías principalmente en la dermis papilar, encontrándose un infiltrado linfocítico perivascular.

En las úlceras Estadio I se observan vasos sanguíneos llenos de eritrocitos con hemorragia marcada, también puede haber ocasionalmente degeneración de los tejidos adyacentes y del tejido celular subcutáneo. En las etapas tempranas de ulceración, además del infiltrado linfocitario se observan neutrófilos y se puede presentar cambios necróticos en los apéndices y tejido celular subcutáneo. En úlceras con escaras se encuentran muchos basófilos, usualmente sin infiltrado inflamatorio.

Modelos animales de úlceras de presión/isquemia

Existen muchos modelos animales en los que se han intentado reproducir úlceras por presión. La mayoría de estos modelos de úlceras crónicas por presión han sido diseñados para estudiar únicamente el papel de la isquemia en la formación de heridas¹⁷ en animales como ratas, conejos y cerdos; utilizando todos el mismo principio: disminuir o eliminar el flujo sanguíneo de los tejidos. Se ha dedicado mucho tiempo en perfeccionar estos modelos, ya que la isquemia y la lesión producida por la reperfusión parecen ser denominadores comunes en todas las heridas crónicas³. A pesar de todos los esfuerzos realizados, actualmente, no se cuenta con un modelo experimental ideal de úlceras en animales.

Hyodo et al¹⁸ crearon un modelo de úlceras en cerdos monoplégicos haciendo una resección unilateral de la raíz nerviosa lumbar en el canal medular, en el que se obtuvieron úlceras de grosor completo y tamaño uniforme, sin presentar complicaciones o morbilidad en los sujetos de experimentación. La principal justificación de estos investigadores fue que la mayoría de úlceras por decúbito se dan en

pacientes con lesiones nerviosas y que los cerdos son muy similares a los seres humanos en lo que a dimensiones, superficie, volumen y cicatrización respecta.

Otros autores crearon modelos utilizando roedores. Pierce Et al¹⁹ creó un modelo en ratas utilizando un magneto en la piel bajo el hombro izquierdo, donde se implantó una placa de metal. El magneto era capaz de comprimir la irrigación sanguínea y luego, al removerlo, se permitió la reperfusión y sus consecuencias (Fig 5). Este modelo es de mucha importancia ya que muchas úlceras por presión se dan en ancianos con enfermedades crónicas que no deambulan, y ellos se caracterizan por tener poco músculo, al igual que el hombro de las ratas. Además este estudio permite estudiar una muestra más grande de animales debido a su bajo costo.

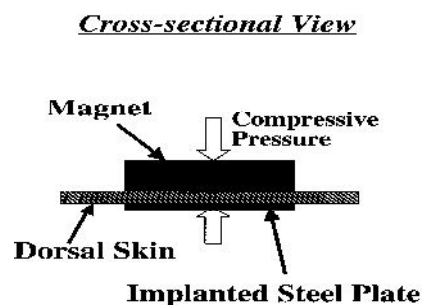


Figura 5. Modelo de compresión por magneto. Se creó una lesión de isquemia/reperfusión utilizando un magneto y una placa metálica insertada bajo la piel de las ratas. Tomado de: Peirce SM et al. *Wound Repair Regen.* 2000;8(1):68-76.

Otro modelo es el Colgajo de McFarlane³, el cual consiste en realizar un colgajo dorsal en ratas. El colgajo original era de 4cm de ancho y 10cm de largo, localizado entre las espinas de las escápulas hasta las crestas ilíacas. Luego se evaluó la presencia o ausencia de necrosis y la formación de circulación colateral. Se observó que la mayoría de colgajos se necrosaban distalmente y en algunos se presentaba una necrosis central, la cual se explicó por la posición encorvada que adoptaban las ratas después del procedimiento. Esta posición producía estrés en el punto central del colgajo, al cual se le sumaba la presión de los vendajes, comprometiendo la circulación.

Se realizaron varias modificaciones al Colgajo de McFarlane, como se puede observar en la Figura 6; Schwartz utilizó un colgajo de 10cmx4cm en el dorso de ratas, realizando una incisión con un bisturí hasta el panículo carnoso, luego lo elevó para separar los tejidos del colgajo, se reposicionó y aseguró con grapas quirúrgicas. Cuatro días después se realizaron heridas sobre el colgajo y se demostró que estas tomaron más tiempo para sanar sin producir necrosis. Las heridas control sanaron a los 8 días y las del grupo

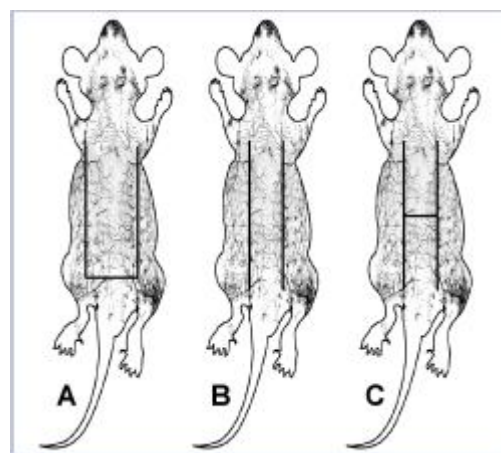


Figura 6. Tipos de colgajos: A) Colgajo original de McFarlane; B) Colgajo bipediculado de Schwarz y C) Colgajo con forma H. Tomado de: <http://www.woundsresearch.com/article/820>

experimental demoraron hasta 12 días.

Quirina et al²⁰ desarrollan un colgajo en forma de H en el dorso de las ratas, en el cual la línea horizontal de la H representa la lesión isquémica y los brazos verticales las heridas control. Es fácilmente reproducible, pero cuenta con limitaciones. El flujo sanguíneo de los tejidos regresa rápidamente a niveles normales, por lo que no se pueden realizar estudios a largo plazo.

Gould et al, realizó el mismo colgajo, pero colocó una hoja de silicón entre el colgajo y el dorso de la rata para evitar la neovascularización y el aporte de nutrientes que recibía el colgajo de la base de la herida, como se puede observar en la Figura 7²¹.



Figura 7. En la primera imagen se marcó el patrón del colgajo; en la segunda imagen ya se realizó el colgajo y se ha separado de la base de la herida; y en la tercera imagen se le ha colocado una barrera plástica y ha sido suturado a su posición original. Tomado de: Prado RP *Acta Cir Bras.* 2006;21(4):258-262.

Muchos autores utilizan modelos con roedores porque son animales pequeños, fáciles de manejar, bajos en costo y fácilmente obtenibles. Pero se debe tomar en cuenta que los roedores son animales con piel flácida, por lo tanto, sus heridas cicatrizan principalmente por contracción, lo que lo diferencia de la cicatrización humana³.

Nitsuma et al²² creó un modelo animal de úlceras por decúbito en orejas de conejos. Para ello utilizó 46 conejos Japoneses Adultos. Se utilizaron las orejas de los conejos por ser un tejido similar al sacro, ya que posee epidermis, dermis, tejidos blandos y cartílago.

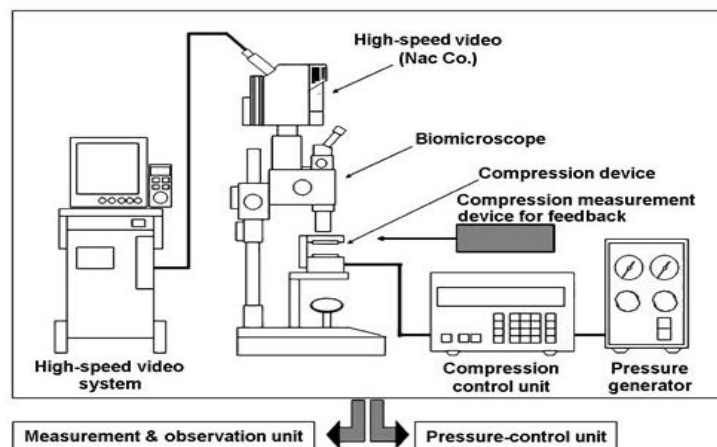


Figura 8. Sistema experimental con su observación de medición y observación y su unidad de presión. Tomado de: Nitsuma J et al. *J Rehabil Res Dev.* 2003;40(1):67-73.

Para formar las úlceras se creó un sistema experimental compuesto por una unidad de presión-control, una unidad de medición y una unidad de observación. (Figura 8). El sistema de compresión consistió en dos piezas de acrílico transparente de 10mm de diámetro operada por aire. La compresión realizada a las orejas de los conejos fue medida regulando la presión del aire.

Durante el experimento se comprimió la parte superior de las orejas de los conejos para impedir el flujo arterio-venoso sin utilizar anestesia. No se utilizó anestesia para excluir los efectos de los anestésicos sobre las hemostasis.

La presión se aplicó según los siguientes protocolos:

- Grupo A: Compresión por 6 horas, liberación por 12 horas. (Repitiéndose tres veces, haciendo un total de 54 horas)
- Grupo B: Compresión por 6 horas, liberación por 6 horas. (Repitiéndose tres veces, haciendo un total de 36 horas)
- Grupo C: Compresión por 12 horas, liberación por 12 horas. (Repitiéndose tres veces, haciendo un total de 72 horas)
- Grupo D: Compresión por 12 horas, liberación por 6 horas. (Repitiéndose tres veces, haciendo un total de 54 horas)

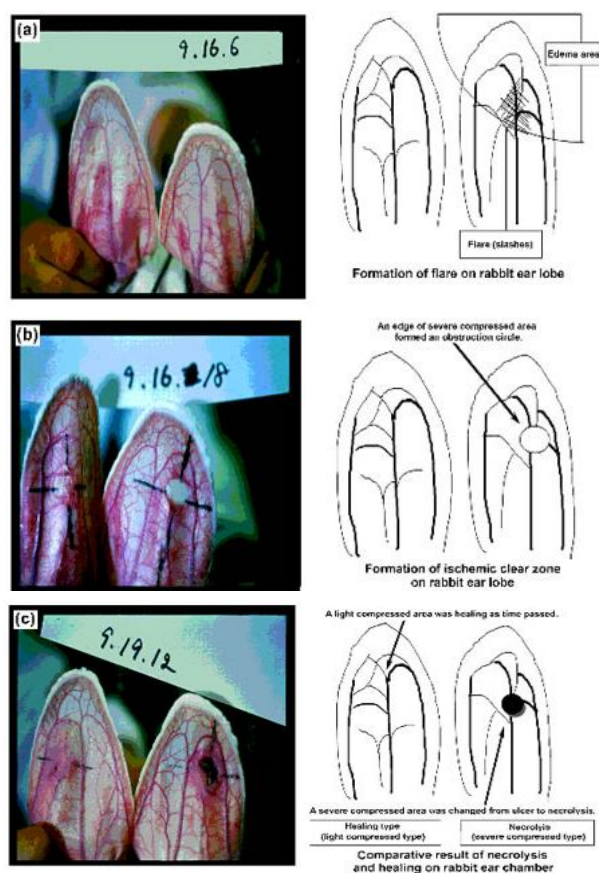


Figura 9. Formación de úlceras experimentales en orejas de conejos. Tomado de: Niitsuma J et al. *J Rehabil Res Dev.* 2003;40(1):67-73

Entre los resultados de este estudio, no se crearon úlceras con una presión de 50mmHg. Según las imágenes de la Figura 9 se observó:

A – GRADO I: Solo se observó eritema, pero no se crearon úlceras.

B- GRADO II-III: Se observó necrosis del tejido y separación de la epidermis. Estas úlceras curaron.

C-GRADO IV: Se observó eritema, edema, necrosis y perforación del tejido. Estas úlceras no sanaron.

Ahn y Mustoe²³ crearon un modelo de úlceras en orejas de conejo de raza neozelandesa, disecando y ligando dos, de las tres, arterias principales que irrigan el tejido. Con este modelo se lograron aproximar tres características que presentan las úlceras crónicas en humanos: 1) Isquemia significativa y prolongada, confirmada por dermofluorometria, PO₂ tisular, PO₂ venoso, pH y temperatura del tejido. 2) Contracción mínima, debido a que la dermis del conejo se encuentra adherida al cartilago. Esta relación íntima de la dermis con el cartilago permite reproducir una herida excisional de espesor completo, con una base avascular²⁴. 3) Este modelo es tolerado bien por animales adultos, los cuales son más susceptibles a la anestesia y cirugía²⁰.

Se utilizaron conejos jóvenes (3-6 meses) anestesiados con Xilazina a 5mg/kg y ketamina a 60mg/kg de peso. Se depilaron la base de las orejas y realizó asepsia y antisepsia con jabón yodado. Tomando en cuenta que la oreja de los conejos esta irrigada por tres arterias principales: La Arteria Rostral, la Arteria Central y la Arteria Caudal (Fig.10); que pueden observarse fácilmente en el dorso de las orejas.

En el modelo inicialmente descrito por Ahn y Mustoe²³, dos, de las tres, arterias principales (Arteria Rostral y la Arteria Central) fueron ligadas con Nylon y en el modelo posterior, descrito por Mark Sisco y Thomas Mustoe²⁰, las arterias (Arteria Rostral y la Arteria Central) fueron cauterizadas, teniendo cuidado de no dañar las venas ni la Arteria Caudal, la cual proveerá el aporte sanguíneo.

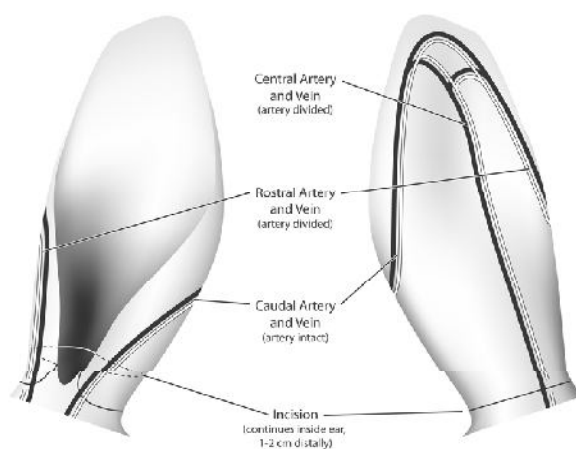


Figura 10. Anatomía Vascular de la oreja izquierda de un conejo. Tomado de: Sisco M, Mustoe TA. *Methods Mol. Med.* 2003;78:55-65.

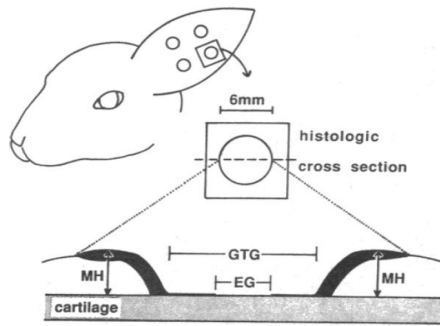


Figura 11. Realización de heridas con un punch dermatológico para biopsia. Tomado de: Sisco M, Mustoe TA. *Methods Mol. Med.* 2003;78:55-65.

Luego se realizaron cuatro agujeros circulares en la cara ventral de cada oreja sin llegar al cartílago con un "punch" dermatológico de 6-7 mm (Fig. 11).

Además, se marcaron los bordes de las heridas con tinta china, como referencia, para evaluar luego la formación del tejido de granulación. Se colocaron vendajes oclusivos y collarines para evitar la contaminación de las heridas y se midió el tejido de granulación y la epitelización, a través de análisis histopatológico (fig.12), que mostró que el 50% de

las úlceras control se encontraban completamente epitelializadas para el día 7; a diferencia de las úlceras isquémicas, que ninguna se encontró completamente epitelializada para este día. Además, para ese mismo día, el 63% de las úlceras del grupo control se encontraban cubiertas completamente por tejido de granulación, mientras que solamente el 39% de las úlceras isquémicas se encontraban cubiertas por este tejido²⁰.

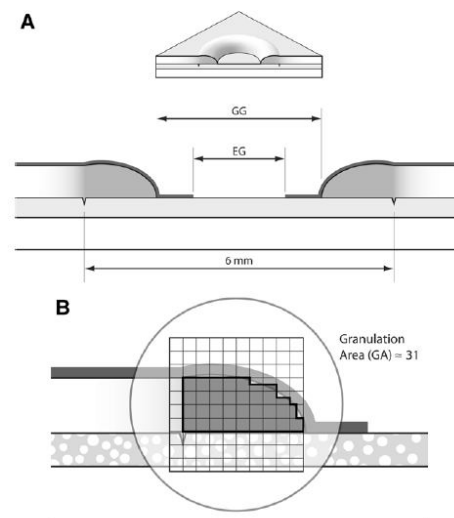


Figura 12. Esquematización del análisis histológico. EG: Espacio epitelial. GG: Espacio de Granulación. GA: Área de granulación. Tomado de Animal models of ischemic wound healing toward an approximation of human chronic cutaneous Ulcers in rabbits and rats.

Métodos de medición de úlceras

La obtención de mediciones exactas y precisas es esencial en la evaluación de las heridas. Existen diferentes métodos para documentar el tamaño de las úlceras, pero actualmente no existe un

instrumento que provea un método uniforme y simple para evaluar la cicatrización²⁵. Hay datos que sugieren que cambios en el tamaño de la úlcera dentro de un periodo de 2 semanas se asocia con la probabilidad de sanar completamente ²⁵.

Para realizar mediciones sobre el tamaño de las úlceras, existen métodos que requieren contacto con la lesión y otros métodos que no. Ambas técnicas de medición pueden determinar el área y el volumen de las úlceras. El mayor problema con las técnicas de contacto es la contaminación y la modificación de la úlcera al entrar en contacto con el aparato medidor. Es por esto que las técnicas no invasivas o sin contacto se están convirtiendo en las técnicas más utilizadas. Sin embargo, se ha propuesto que estas técnicas pueden ser tardadas, caras y poco practicas para el uso clínico convencional²⁶.

Entre los métodos utilizados se encuentra la utilización de una regla desechable para determinar las dimensiones. Con este método se determinan la longitud vertical y horizontal de las úlceras y se multiplican, obteniendo un área estimada. Este método es confiable, pero puede presentar limitantes al tratarse de de úlceras irregulares. Más aún, esta técnica tiende a sobre estimar el área de la úlcera y su validez disminuye a medida disminuye el tamaño de la lesión²⁷.

Otro método, muy popular, consiste en trazar los bordes de la herida en acetato. Esta imagen puede ser colocada posteriormente en una cuadrícula milimetrada y contar la cantidad de milímetros cuadrados en su superficie. La desventaja es que este proceso consume mucho tiempo, especialmente en lesiones grandes. La imagen también puede ser cortada y luego pesada en una báscula de precisión. Si bien es cierto, este método es más rápido, pero la segunda transferencia y el recorte de la figura disminuyen la precisión de la técnica²⁷.

Analizar las imágenes trazadas en un acetato utilizando un planímetro computarizado o electrónico, para medir la superficie de la herida, parece ser un método práctico y ha sido estudiado ampliamente^{28,29,27}. Las desventajas de este método radican en la dificultad para identificar el borde de la úlcera y trazar de forma inadecuada los bordes de la herida por la presencia de pliegues cutáneos o la deformación de la ulcera al poner le acetato sobre esta. La efectividad de esta prueba disminuye con la disminución del área de la herida.

La estereofotogrametría es una disciplina que crea modelos en 3D a partir de imágenes 2D, para de esta manera obtener características geométricas de los objetos que representan, mediante el uso de relaciones matemáticas establecidas en la geometría proyectiva, y de la visión estereoscópica que posee en forma natural el ser humano. Ya que las imágenes de los objetos son obtenidas por medios

fotográficos, la medición se realiza a distancia, sin que exista contacto físico con el objeto³⁰. Esta técnica utiliza dos cámaras fotográficas para reconstruir una imagen tridimensional en que se puede determinar el área y el volumen de la úlcera. Esta técnica tridimensional toma tiempo, es cara y requiere entrenamiento especial para desarrollarla; haciéndola poco útil para el uso clínico rutinario.

Una variación de este método, referido como a la técnica computarizada para el análisis de imágenes, utiliza una cámara digital y un software de computadora. Esta técnica es no invasiva y permite la documentación de una serie de imágenes para determinar las características visuales de la úlcera y sus dimensiones. Esta técnica no requiere entrenamiento especial y es considerablemente más rápida y menos costosa que la estereofotogrametría. Además, no requiere contacto directo con la lesión²⁷. Con el análisis computarizado de las lesiones, se toman las fotografías con una cámara digital y se almacenan en formato .TIFF, a una escala determinada, para posteriormente ser analizados²⁷.

Se ha descrito que el método de utilización de fotografías digitales es mucho más versátil que el método de trazar los bordes de las lesiones en acetato. Se dice que provee mejor un mejor registro visual de las úlceras, más información sobre la composición del tejido en la base de estas, los márgenes y la profundidad. Sin embargo, se necesita destreza para configurar y operar el equipo fotográfico²⁶.

Se ha encontrado que la técnica de análisis computarizado es un método tan confiable y preciso como el método de medición manual en las lesiones en humanos y es más confiable y preciso para evaluar la superficie de lesiones en animales²⁷. Además el análisis computarizado ha demostrado ser más precisa que las mediciones de los diámetros resultantes del análisis de las longitudes^{31,32}.

Haas definió "confiabilidad" como la medida de la concordancia, consistencia y repetitividad de los resultados experimentales. Se han desarrollado estudios de confiabilidad para evaluar la efectividad de varias herramientas de medición²⁶.

Tomando en consideración las diferentes formas de estudios, aun existe confusión sobre cual herramienta provee los datos más exactos y confiables, por lo que no existe un "Gold Standard" para las técnicas de medición. Cada una de las técnicas tiene sus fortalezas y debilidades. Lo que si se tiene claro es las mediciones de volumen y área son necesarias para evaluar el progreso de la cicatrización²⁶.

Además del método de obtención de imágenes por fotografías, se ha descrito la utilización de un escáner con resultados favorables^{33,34}. Khan et al utilizó esta técnica para la obtención de imágenes de úlceras gástricas en ratones, concluyendo que la utilización de imágenes escaneadas provee una

metodología simple, rápida y eficiente que podría reemplazar la utilización de fotografías para la visualización de úlceras gástricas experimentales. Por otra parte, Gonzales validó la utilización de esta técnica en nuestro país.

Generalidades sobre los conejos

Las razas de conejo más utilizadas en investigación son la New Zeland White (albino) y la Dutch, Polish, Californian y New Zeland Red. Las razas generalmente varían mucho en tamaño y son clasificadas de acuerdo al peso en pequeñas: <2 kg, medianas: 2-5 kg y grandes: >5 kg.

La raza New Zeland White (albino) es la más utilizada en los laboratorios canadienses. Su mediano tamaño y su naturaleza dócil hacen de estos conejos fáciles de mantener, manejar y retener; mientras que sus largas orejas que carecen de pigmento facilitan las inyecciones y toma de muestras venosas. Desafortunadamente, a pesar de ser clasificados como medianos, estos conejos, con la edad, ganan peso y se vuelven difíciles de manejar. Además, tienden a consumir grandes cantidades de comida.

Los conejos adultos deben ser mantenidos individualmente en jaulas metálicas, preferentemente de acero inoxidable, con piso de malla con bandeja para la recolección de excretas. La ventilación es vital para evitar enfermedades respiratorias. Rutinariamente, un periodo de luz de 12-14hrs es satisfactorio. Se debe evitar encender la luz repentinamente sin aviso, durante la etapa de oscuridad, ya que puede provocar consternación, ovulación espontánea y ocasionalmente daño autoinflingido. También deberá evitarse sonidos fuertes y repentinos.

La reingestión de las heces es normal en los conejos y, de hecho, es esencial para mantener una adecuada nutrición. Las jaulas deben ser limpiadas y desinfectadas por lo menos 1 vez por semana. Las bandejas de las excretas deben ser limpiadas tantas veces como sea necesario, para evitar la acumulación de amonio en las instalaciones y debe realizarse fuera del cuarto donde se encuentran los animales.

En cuanto a la manipulación de los animales, al ser removidos de las jaulas o ser levantados deberán ser tomados por la piel sobre los hombros, con una mano, y la otra mano tomando la piel sobre la espalda o sosteniendo el abdomen. Nunca deberán ser tomados por las orejas, ya que estas se lesionan

fácilmente, son órganos sensitivos que juegan un papel importante en la regulación de la temperatura corporal, así como en la audición.

Anestesia y cirugía.

La anestesia en conejos presenta dificultades bien particulares ya que a) la respuesta a los anestésicos generalmente utilizados presenta gran variación y el margen de seguridad es estrecho; y b) hay una gran incidencia de enfermedades respiratorias altas que pueden complicar la anestesia. El riesgo de estos problemas puede ser disminuido con un buen examen clínico del animal, previo a la anestesia y con un monitoreo continuo de esta³⁵.

La profundidad de la anestesia se monitorea principalmente con: a) la frecuencia cardiaca y b) el reflejo de retiro de la extremidad ante un pinchón en el dedo o el pie. La anestesia operatoria generalmente se alcanza cuando la frecuencia respiratoria se reduce a 15-20 respiraciones por minuto (la frecuencia respiratoria normal es de 35-56 respiraciones por minuto) y el reflejo de retiro de la extremidad al pinchar el dedo o el pie disminuye o está ausente³⁵.

La premedicación con tranquilizantes puede ser útil para calmar al animal y facilitar la inducción con un anestésico general, así como disminuir la dosis necesaria para la inducción y mantenimiento de la anestesia³⁵.

Tabla 1. Drogas utilizadas para la preanestesia de conejos

Droga	Dosis	Vía de administración	Efecto o respuesta
Sulfato de Atropina	0.04-0.1 mg/kg	IM EV	Tranquilizante por 30-60 minutos
Acetilpromazina	1.0 mg/kg	IM	Tranquilizante por 30-60 minutos
Clorpromazina^a	25 mg/kg	IM	Tranquilizante
Diazepam	5-10 mg/kg	IM	Sedación por 60-100 minutos
Propiopromazina	5-10 mg/kg	IM	Tranquilizante
Ketamina	20-44 mg/kg	IM	Inmovilización ^b
Xilacina	3-5mg/kg	IM	Sedación

^a La administración intramuscular puede producir miositis y edema en el lugar de administración.

^b La analgesia no es suficiente para realizar cirugías

Tomado de CCAC guidelines. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, vol. 2 (1984)

Los anestésicos intravenosos deben ser administrados lentamente, en forma diluida, con el total de la dosis a administrar dividida según la respuesta del animal. Los barbitúricos no se recomiendan en conejos debido a que la depresión respiratoria reduce el margen de seguridad.

Tabla 2. Anestésicos inyectables en conejos

Droga	Dosis	Vía de administración	Efecto o Respuesta
Ketamina + Xilacina	35 mg/kg + 5mg/kg	IM	Sedación por 20-70 minutos
Fentanilo/Droperidol	0-17 mk/kg	IM	Sedación
Fantanilo/Fluanisone	0.3-0.5 ml	IM	Sedación-Anestesia
Pentobarbital	20-40 mg/kg	EV	Anestesia
Tiopental	50 mg/kg	EV	Anestesia por 5-10 minutos
Tiamilal	22-54 mg/kg	EV	Anestesia por 5-10 minutos
Uretano^a	1.5 gm/kg	IP	Inicio de acción de 45-60 minutos con sedación de 5-6 horas

^a Utilizado únicamente para estudios en los cuales no sobreviven los animales. Tomado de CACC guidelines. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, vol. 2 (1984).

METODOLOGÍA

Tipo de estudio:

Diseño experimental analítico

Universo y muestra:

El universo está conformado por la población de conejos de raza Neozelandesa de granja. Como muestra, se escogerán aleatoriamente 5 conejos machos 3.5kg \pm 0.5 kg.

Adicionalmente, se utilizó un grupo de 3 conejos de las mismas características obtenido del mismo universo, no incluido en el estudio y que sirvió para identificar la anatomía, ensayar las técnicas quirúrgicas propuestas por Mustoe, para crear la lesión isquémica; la obtención de

imágenes y la validación del método a utilizar para el análisis de las lesiones. Se realizaron 4 úlceras en cada oreja (de los 3 conejos) y se enviaron 4 muestras de úlceras, tomadas de 2 conejos diferentes, para análisis histopatológico el día de su realización.

Criterios de inclusión:

- Conejos de raza Neozelandesa
- Sexo masculino
- Peso de 3.5 ± 0.5 Kg
- Que no presenten ninguna patología

Criterios de exclusión:

- Que presenten infestación por Ácaros
- Conejos que presenten un proceso de infección asociada a la intervención realizada.
- Conejos que mueran durante el desarrollo del estudio.
- Conejos que presentan daño al cartílago subyacente durante la realización de las úlceras con el punch para biopsia.

Tipo de muestreo:

Probabilístico, aleatorio simple.

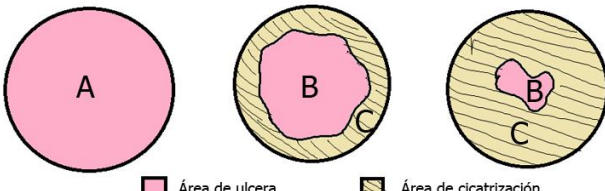
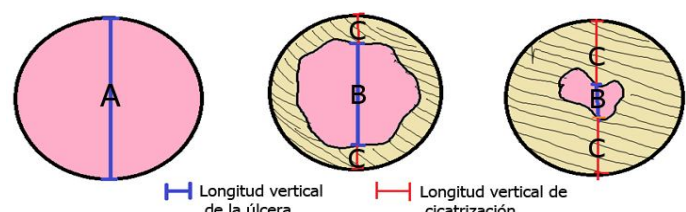
Los 5 sujetos de experimentación será identificada con una serie numérica de 1 a 5.

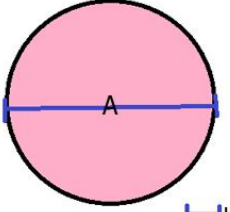
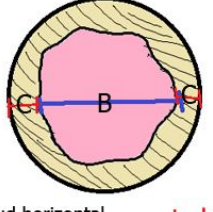
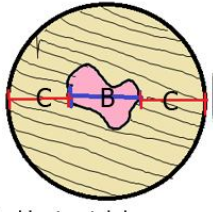
Muestra N=40 úlceras (se realizarán cuatro úlceras en cada oreja de cada conejo):

- a) Grupo Isquémico: 20 úlceras que se realizarán en las orejas derechas de cada conejo donde se ligarán las Arterias caudal y rostral.
- b) Grupo Control: 20 úlceras que se realizarán en las orejas izquierdas de cada conejo donde no se ligan las Arterias, sirviendo de grupo control.

Definición operacional de las variables:

Variables	Definición conceptual	Dimensiones
Peso de Conejo	Cada conejo se pesará previamente al procedimiento quirúrgico.	Kilogramos

<p>Área inicial de las úlceras (día 0)</p>	<p>Medida del área de cada úlcera utilizando la herramienta de "freehand" del programa Image J posterior a su realización en el día 0.</p>	<p>Milímetros cuadrados</p>
<p>Área de tejido cicatrizado al día 7 y 14.</p>	<p>Se obtiene substrayendo del área inicial de la úlcera, el área del día 7 ó 14.*</p> <p>*En caso de las úlceras que no estén completamente cicatrizadas. Si se encuentran cicatrizadas completamente, el área de cicatrización será igual que el área inicial de la úlcera.</p> <div style="text-align: center;"> <p>1. Área de úlcera día 0 2. Área de cicatrización día 7 3. Área de Cicatrización día 14</p>  <p>A = Área de inicial úlcera; B = Área residual de úlcera (día 7 y 14); C = Área de cicatrización (día 7 y 14)</p> </div>	<p>Milímetros cuadrados</p>
<p>Longitud vertical y horizontal inicial (día 0)</p>	<p>Medida de la longitud en los planos vertical y horizontal tomando como referencia los bordes más distantes, posterior a su realización en el día 0.</p>	<p>Milímetros</p>
<p>Longitud de cicatrización vertical para los días 7 y 14.</p>	<p>Medida de longitud vertical obtenida al restar el valor del día 0 con el valor del día 7 o 14.*</p> <p>*En caso de las úlceras que no estén completamente cicatrizadas.</p> <div style="text-align: center;"> <p>1. Longitud vertical de úlcera día 0 2. Longitud vertical de cicatrización al día 7 3. Longitud vertical de cicatrización al día 14</p>  <p>A = Longitud vertical de úlcera; B = longitud vertical residual de la úlcera al día 7 y 14; C = longitud vertical de cicatrización de la úlcera al día 7 y 14</p> </div>	<p>Milímetros</p>

<p>Longitud de cicatrización horizontal para los días 7 y 14.</p>	<p>Medida de longitud horizontal, obtenida al restar al valor del día 0 el valor del día 7 ó 14.*</p> <p>*En caso de las úlceras que no estén completamente cicatrizadas.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; text-align: center;"> <div data-bbox="418 367 646 640"> <p>1. Longitud horizontal de úlcera día 0</p>  </div> <div data-bbox="698 367 909 640"> <p>2. Longitud horizontal de cicatrización día 7</p>  </div> <div data-bbox="961 367 1172 640"> <p>3. Longitud horizontal de cicatrización día 14</p>  </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <p>— — Longitud horizontal de la úlcera — — Longitud horizontal de cicatrización de la úlcera</p> <p>A = Longitud horizontal de úlcera; B = longitud horizontal residual de la úlcera al día 7 y 14; C = longitud horizontal de cicatrización de la úlcera al día 7 y 14</p> </div>	
<p>Velocidad de cicatrización</p>	<p>Área de tejido cicatrizada por día. Calculado al dividir el área total de cicatrización del día 14 entre los días de estudio.</p> <p>Área de cicatrización al día 14 / 14 días</p>	<p>Milímetros cuadrados por día.</p>
<p>Tejido de de Granulación</p>	<p>Tejido de aspecto laxo rosado claro al colorearlo con tinción hematoxilina-eosina, con proliferación de fibroblastos y nuevos vasos sanguíneos de pequeño calibre.</p>	<p>Presencia de tejido de granulación en los cortes histológicos al día 14.</p>
<p>Tejido de Epitelización</p>	<p>Células escamosas con coloración morada al teñirlo con hematoxilina-eosina.</p>	<p>Presencia de epitelio escamoso</p>

El bienestar de las unidades de experimentación se asegurará mediante el seguimiento de las guías del Consejo Canadiense de cuidado animal (CCAC) del año 2007. Serán alimentados con concentrado para conejos y se proveerá agua *ad libitum*. Una vez finalizado el experimento, se procederá a la realización de la eutanasia siguiendo las normas de la "American Veterinary Medical Association".

Métodos y Técnica:

Los sujetos de experimentación fueron sometidos a un ayuno completo de seis horas previo al procedimiento.

Se obtuvo el peso de los conejos utilizando una báscula y se calculó la cantidad de anestésicos a utilizar (Anexo 1).

Preparación de los animales:

Los conejos machos de raza Neozelandesa con un peso de 3.5 ± 0.5 kg fueron anestesiados con ketamina (60mg/kg) y xilacina (5mg/kg) intramuscular.

Se rasuraron las orejas tanto en la parte anterior como posterior, además se rasuró la base de la oreja derecha de forma circunferencial. Se utilizó crema depilatoria en la parte interna de ambas orejas, esperando 5 minutos para que ejerciera su efecto y luego se retiró utilizando gasas con agua estéril²⁰.

Luego se realizó asepsia y antisepsia con jabón yodado y agua estéril de ambas orejas, dejando secar. Se colocó un campo estéril sobre todo el conejo, dejando únicamente expuesta la oreja derecha.

Disección vascular:

Se visualizaron las tres arterias en el dorso de la oreja derecha del conejo. Utilizando una hoja de bisturí No15, se realizó una herida circunferencial de la dermis en la parte externa de la oreja, dejando 1cm de distancia entre la base.

Después, se identificaron las tres arterias dentro de la dermis, luego se disecaron de los tejidos subyacentes, utilizando una lupa con ampliación de 25X y microdisectores. Al estar disecadas, se realizó la incisión más profunda hasta el nivel del cartílago. Luego se ligaron las Arterias Rostral y Central con Seda 5-0, teniendo cuidado de no dañar la Arteria Caudal y respetando las venas acompañantes. Para finalizar se suturó la herida con Nylon 5-0.

Realización de las heridas

Utilizando un punch de 6mm se crearon cuatro heridas circulares a través de la epidermis llegando hasta el cartílago del lado interno de las dos orejas sin dañarlo, ya que esto generaría necrosis. Posteriormente, se limpió ávidamente el fondo de la úlcera para retirar remanentes de pericondrio del cartílago, lo cual es de mucha importancia para garantizar una base avascular²⁰.

Luego se marcaron los bordes de cada herida con tinta china para facilitar su ubicación, se dejó secar y se cubrieron las heridas con Tegaderm.

Se colocaron collarines de caninos para evitar la contaminación de las heridas y se reubicaron de nuevo en sus jaulas.

Se revisaron las heridas buscando úlceras secas o infectadas (las cuales pudieran alterar el resultado) y se retiraron los puntos de la herida de la base de la oreja derecha al día 7.

Previamente a la obtención de las imágenes digitales las úlceras fueron limpiadas con abundante solución salina, removiendo todo el tejido necrótico, secreción y detritos posibles³¹.

Posterior a la obtención de imágenes, se realizó limpieza de las heridas con jabón yodado y solución salina y se cubrieron nuevamente con Tegaderm®. Finalmente, se recolocaron los collarines para proteger las heridas.

Análisis macroscópico:

Digitalización de imágenes:

Se obtuvieron imágenes los días 0, 7 y 14 colocando la oreja del conejo sobre papel transparente y luego en un escáner "HP psc1210", identificándose con el número del conejo, oreja derecha o izquierda y el correlativo de la lesión por cuadrantes: cuadrante superior izquierdo = A, cuadrantes superior derecho = B, cuadrantes inferior izquierdo = C, cuadrante inferior derecho = D. (Fig. 13)

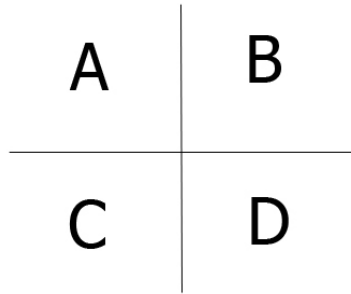


Figura 13. Esquema de distribución de las úlceras por cuadrantes.

Posterior a la realización de las úlceras se digitalizaron imágenes de cada oreja, mediante la utilización de un escáner “HP psc1210” a una resolución de 600 dpi, archivándose en formato “.TIFF”. Se Verificó cada imagen al momento de realizar la digitalización para garantizar su utilidad en el análisis. Luego, utilizando el programa “Photoshop CS5 Extended 12x32”, se seleccionó cada úlcera y se cortaron individualmente. Se ajusto la exposición de cada imagen hasta obtener una definición clara de los bordes de la úlcera y se cambió el tipo de imagen a Blanco y negro.

El análisis se realizó utilizando el programa “Image J 1.43u” (accesible en <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Se fijó una escala de medición a 24.600 píxeles/mm a un aumento de 3x. Para esto, se analizó una imagen de una regla digitalizada con el escáner a la misma resolución del resto de imágenes, como se muestra en Figura 14, y se realizaron medidas de longitud horizontal y vertical y de área de la úlcera, almacenándose en un libro de “Microsoft Excel 2007”.

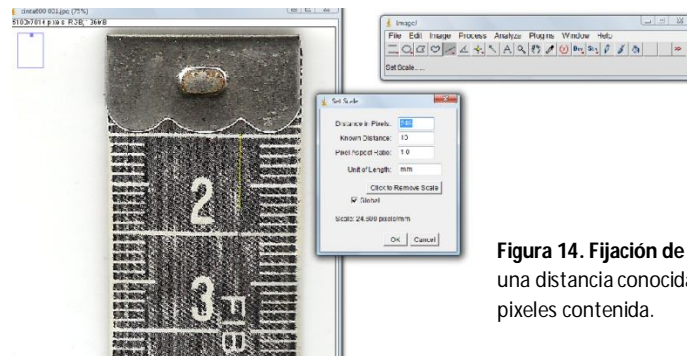


Figura 14. Fijación de escala de medición. Se mide una distancia conocida y se fija la cantidad de píxeles contenida.

Para las mediciones de longitud horizontal y vertical de la úlcera se utilizó la herramienta de selección de “línea recta” y se trazó una línea para unir los bordes opuestos. (Fig. 15)

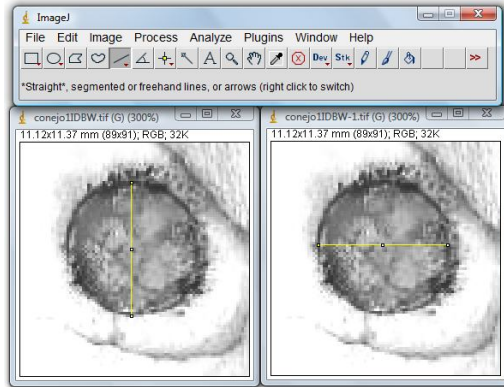


Figura 15. Medición de longitudes verticales (Izq) y horizontales (Der).

Utilizando una computadora Tablet HP® Pavilion Tx 1332, se trazó el borde de la herida, seleccionándola con el stylus sobre la pantalla táctil de la computadora; mediante la herramienta de selección “freehand selection” y puntos múltiples. Finalmente, con el área seleccionada, el programa calculó el área total de la herida^{31,33,34}.(Fig. 16)

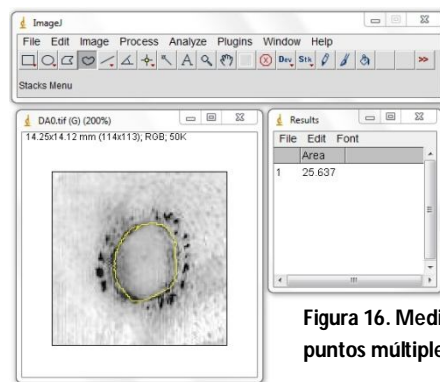


Figura 16. Medición de área con herramienta de puntos múltiples.

Se obtuvieron dos valores de áreas con herramientas diferentes, los cuales fueron sometidos a pruebas estadísticas de normalidad, para validar el método y luego compararlos entre ellos. El método de medición del área de las úlceras de este estudio se decidió de acuerdo a los resultados de la validación.

Análisis microscópico

Es de mucha importancia realizar el estudio histopatológico, como menciona Gonzales et al, el estudio de las imágenes es costo efectivo, de fácil acceso y no se requiere una preparación técnica para su realización. Sin embargo, este software únicamente proporciona información sobre el área superficial de la lesión³⁴.

Por lo cual, se enviaron 4 muestras en total, tomadas de 2 conejos diferentes, no incluido en el grupo experimental de úlceras realizadas el día 0, para su análisis microscópico para comprobar la profundidad de la úlcera y la integridad del cartilago. Al día 14, posterior a la digitalización de las imágenes, se realizó eutanasia de 2 conejos, en el que macroscópicamente se visualizaba cicatrización completa de las lesiones; y se amputaron ambas orejas con un bisturí para ser estudiadas. Se enviaron 4 muestras de las úlceras completamente cicatrizadas.

Luego se separaron las cuatro heridas dejando un margen de 2-5mm por fuera de los bordes de cada herida. Cada muestra fue fijada en formalina al 10% durante la noche para posteriormente realizar el estudio histológico y ser enviados al laboratorio de patología.

Procesamiento y análisis de datos

Se utilizara SPSS 15.0 para Windows, para el análisis estadístico de los resultados. Cada una de las variables fue sometida a pruebas de normalidad para determinar el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas para su análisis.

- Pruebas de normalidad:
 - Primer paso: Histogramas y Graficos de Cajas
 - Segundo paso: Coeficientes de forma (Asimetría y Curtosis)
 - Tercer paso: Test de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov
- Las variables con distribución normal fueron analizadas por grupos, utilizando la prueba T de Student de muestras independientes.
- Las variables con distribución fuera de la normalidad estadística fueron analizadas utilizando la prueba de Mann-Whitney.

Consideraciones éticas

Los conejos Fueron manejados bajo las regulaciones del protocolo de uso de animales en proyectos experimentales del "Canadian Council Animal Care 2007". La eutanasia se realizó de acuerdo a lo establecido por la "American Veterinary Medical Association".

Resultados

Ensayo de técnica quirúrgica

Durante la disección se encontró que las arterias se acompañan de una vena y un nervio y se encuentran posterior a las venas; lo cual constituye una variante a la anatomía descrita por Mustoe et al. (Fig. 17)

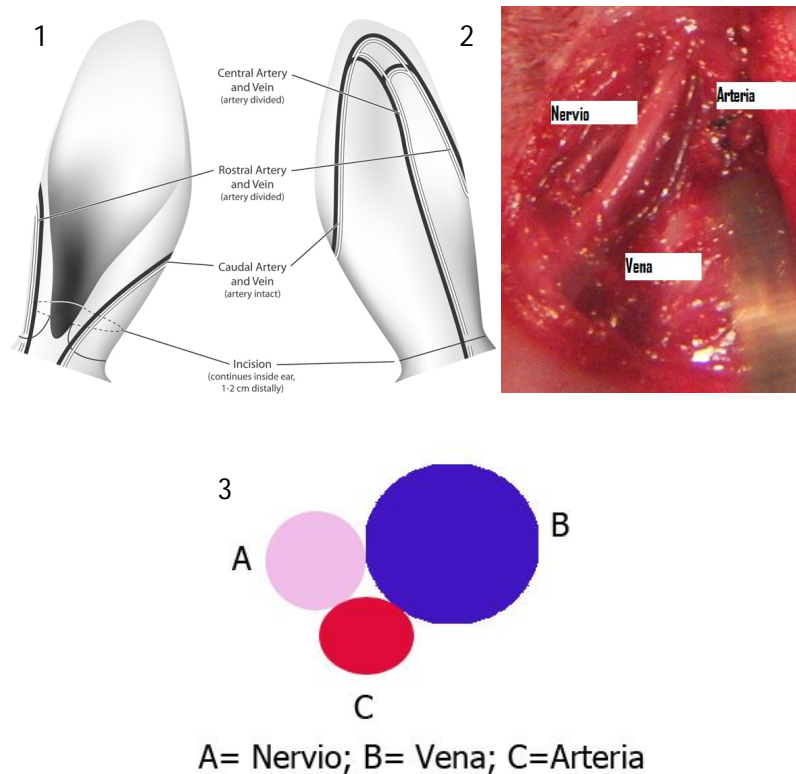


Figura 17. En esta imagen se muestra la anatomía descrita en la literatura (1) comparada con la Anatomía encontrada durante el procedimiento (2). La Arteria central se encuentra seccionada. En el esquema inferior se representa la relación de los vasos sanguíneos y el nervio (3).

Se obtuvieron heridas de área similar, de las que se enviaron 8 muestras para estudio histopatológico. De estas se realizó un corte transversal de 1.5 cm de longitud y 2mm de espesor (Fig. 18). Los cortes mostraron que las heridas abarcaron la profundidad de la dermis sin dañar el cartílago subyacente, validando nuestra técnica quirúrgica. (Fig. 19)

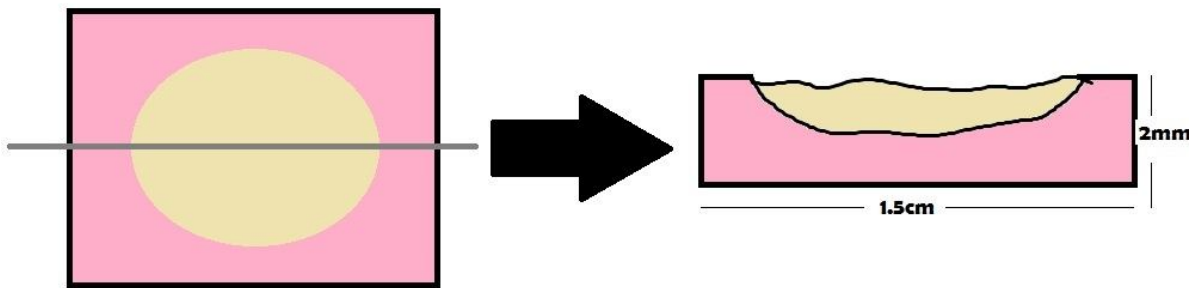


Figura 18. Esquema de corte histológico utilizado para análisis.



Figura 19. Imagen histopatológica muestra día 0. Nótese la presencia del cartilago intacto y la ausencia de pericondrio.

Ocho úlceras fueron escaneadas y analizadas con el programa image J (Anexo 2), obteniéndose un área de las úlceras para el día 0 media de 26.75 mm^2 con la herramienta de selección "freehand" y de 26.59 mm^2 con la herramienta de selección de puntos múltiples. Además se obtuvo una longitud vertical media de la úlcera de 5.78 mm y una media de longitud horizontal de 5.94 mm .

Para el día 7 se encontró una media del área residual de las úlceras de 18.97 mm^2 para las orejas isquémicas y de 16.25 mm^2 para el grupo control, con la herramienta freehand y de 18.06 mm^2 para las orejas isquémicas y 15.75 mm^2 para el grupo control, con la herramienta de puntos múltiples. Además, se encontró una longitud vertical residual de 5.17 mm en el grupo isquémico y 3.47 mm en el grupo

control. Para la longitud horizontal de la úlcera se encontró 4.67mm para el grupo isquémico y 4.88 para el grupo control.

Para el día 14 se encontró una media del área residual de las úlceras de 4.94 mm² para las orejas isquémicas y de 1.03 mm² para el grupo control por la herramienta freehand; y 4.50mm² par las orejas isquémicas y 4.04mm² para las orejas control con la herramienta de puntos múltiples. Además, se encontró una longitud vertical residual de la úlcera de 2.56mm en el grupo isquémico y 1.07mm en el grupo control. Para la longitud horizontal de la úlcera se encontró 3.10mm para el grupo isquémico y 0.70mm para el grupo control.

Validación de método de medición de área

Se excluyeron dos de las úlceras en el grupo isquémico, pues se evidenció, macroscópicamente, daño al cartílago durante el procedimiento. Quedando N= 38 úlceras, en las que el grupo isquémico= 18 úlceras y grupo control= 20 úlceras.

Después de obtener los valores de las áreas originales de las úlceras (Día 0) con ambas herramientas de selección (Anexo 3), se evaluaron con pruebas estadísticas para determinar su normalidad.

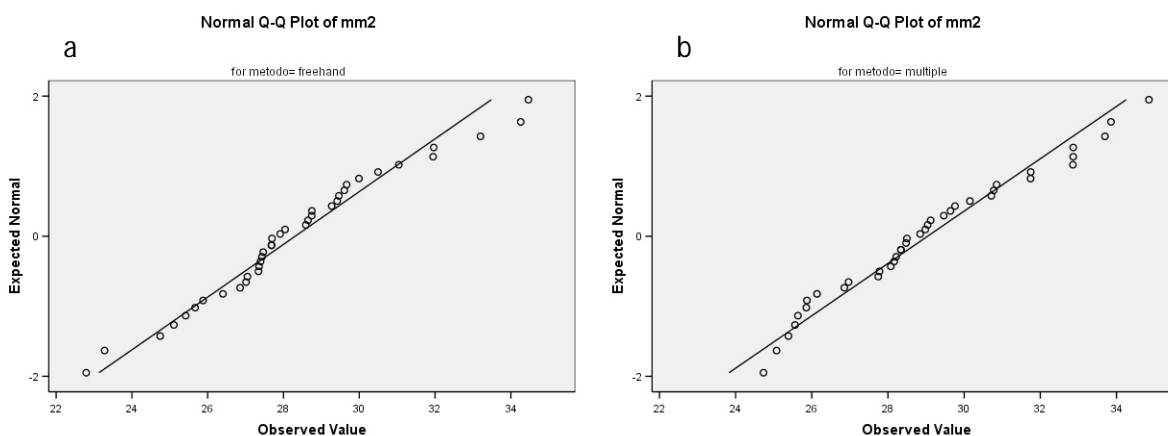


Gráfico 1. Regresión lineal de áreas medidas por selección “Freehand”(a) y de puntos múltiples (b).

Pruebas de Normalidad para la validación

	metodo	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
mm2	freehand	.094	38	.200(*)	.971	38	.410
	multiple	.093	38	.200(*)	.962	38	.226

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

Tabla 3. Pruebas de normalidad de las áreas iniciales con las herramientas de selección "freehand" y puntos múltiples.

Como se encontró que presentaban distribución estadística normal, se compararon los grupos utilizando la prueba T de Student.

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
mm2	Equal variances assumed	.082	.775	-1.197	74	.235	-.73187	.61156	-1.95044	.48670
	Equal variances not assumed			-1.197	73.996	.235	-.73187	.61156	-1.95044	.48670

Tabla 4. Comparación entre medidas de área original por herramienta de selección "freehand" y puntos múltiples.

Reproducción del modelo

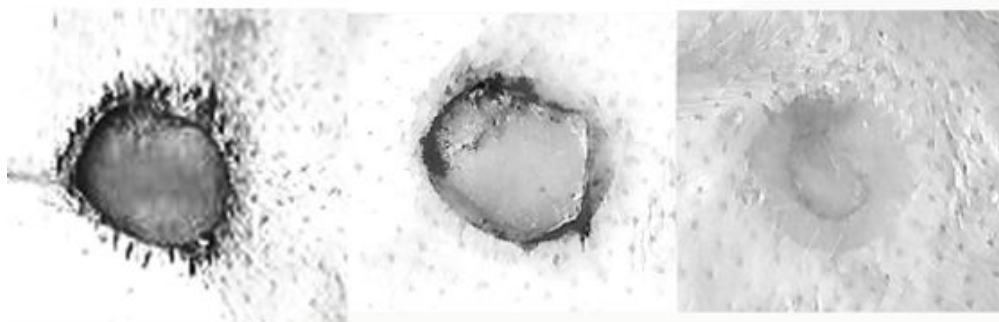
Se realizaron mediciones de longitudes y áreas en los días 0, 7 y 14. (Anexos 6, 7 y 8) Como se mencionó anteriormente, se excluyeron dos de las úlceras en las orejas isquémicas (Conejo, 1 úlcera b; y conejo 3, úlcera c) por daño al cartílago con el "punch" dermatológico durante la realización de la herida. Es importante destacar que no existieron pérdidas de sujetos de experimentación ni infecciones en las heridas.

Úlcera conejo 3, oreja isquémica (derecha), cuadrante B

Día 0

Día 7

Día 14



1) Área inicial: 25.66mm²;
2) Longitud vertical inicial: 5.59mm;
3) Longitud horizontal inicial: 6.00mm

1) Área de cicatrización: 12.02mm²;
2) Longitud de cicatrización vertical: 1.37mm;
3) Longitud de cicatrización horizontal: 1.65mm

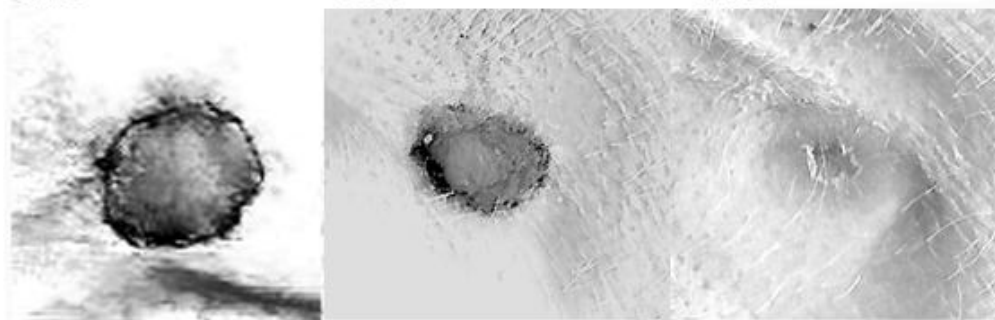
1) Área de cicatrización: 19.54mm²;
2) Longitud de cicatrización vertical: 2.24mm;
3) Longitud de cicatrización horizontal: 3.75mm

Úlcera conejo 3, oreja control (izquierda), cuadrante B

Día 0

Día 7

Día 14



1) Área inicial: 31.04mm²;
2) Longitud vertical inicial: 6.42mm;
3) Longitud horizontal inicial: 5.54mm

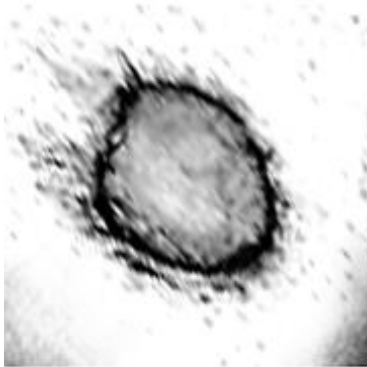
1) Área de cicatrización: 25.62mm²;
2) Longitud de cicatrización vertical: 4.19mm;
3) Longitud de cicatrización horizontal: 1.82mm

1) Área de cicatrización: 29.12mm²;
2) Longitud de cicatrización vertical: 5.05mm;
3) Longitud de cicatrización horizontal: 4.10mm

Figura 20. Evolución de la cicatrización de las úlceras en el grupo isquémico y el grupo control. Se observa la cicatrización progresiva de las úlceras, que a simple vista, es mayor en el grupo control que en el grupo isquémico. También se muestra el aumento del área de cicatrización y de las longitudes de cicatrización. Nótese como para el día 14 las úlceras control se encuentran cicatrizadas casi en su totalidad. Continúa siguiente página

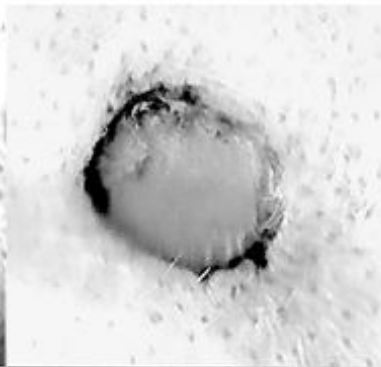
Úlcera conejo 4, oreja isquémica (derecha), cuadrante B

Día 0



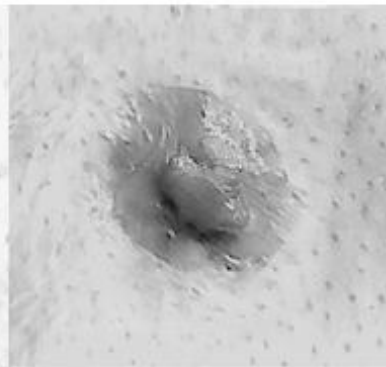
1) Área inicial: 27.68mm²;
2) Longitud vertical inicial: 5.91mm;
3) Longitud horizontal inicial: 5.77mm

Día 7



1) Área de cicatrización: 5.18.29mm²;
2) Longitud de cicatrización vertical: 1.19mm;
3) Longitud de cicatrización horizontal: 0.89mm

Día 14



1) Área de cicatrización: 24.77mm²;
2) Longitud de cicatrización vertical: 3.17mm;
3) Longitud de cicatrización horizontal: 4.31mm

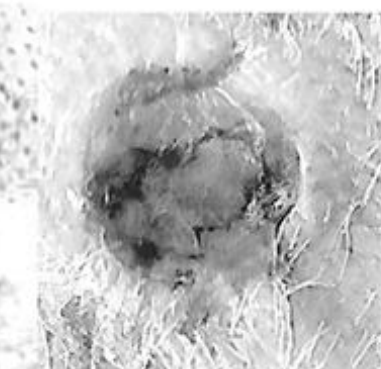
Úlcera conejo 4, oreja control (izquierda), cuadrante B

Día 0



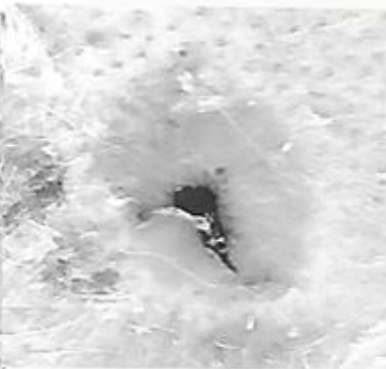
1) Área inicial: 34.26mm²;
2) Longitud vertical inicial: 6.98mm;
3) Longitud horizontal inicial: 5.91mm

Día 7



1) Área de cicatrización: 23.85mm²;
2) Longitud de cicatrización vertical: 4.96mm;
3) Longitud de cicatrización horizontal: 2.25mm

Día 14



1) Área de cicatrización: 32.87mm²;
2) Longitud de cicatrización vertical: 5.83mm;
3) Longitud de cicatrización horizontal: 4.94mm

Figura 20. Evolución de la cicatrización de las úlceras en el grupo isquémico y el grupo control (Cont.). Se observa la cicatrización progresiva de las úlceras, que a simple vista, es mayor en el grupo control que en el grupo isquémico. También se muestra el aumento del área de cicatrización y de las longitudes de cicatrización. Nótese como para el día 14 las úlceras control se encuentran cicatrizadas casi en su totalidad. Viene de página anterior.

Test de normalidad de las variables

Se analizaron los resultados de las mediciones para verificar la normalidad de las variables, utilizando en primer lugar histogramas (Anexo 4) y gráficos de caja (grafico 4)

Se obtuvieron histogramas con distribución normal de todos los datos en todos los grupos de cada variable, excepto en el grupo control 7 días para la variable longitud vertical como se puede ver a continuación:

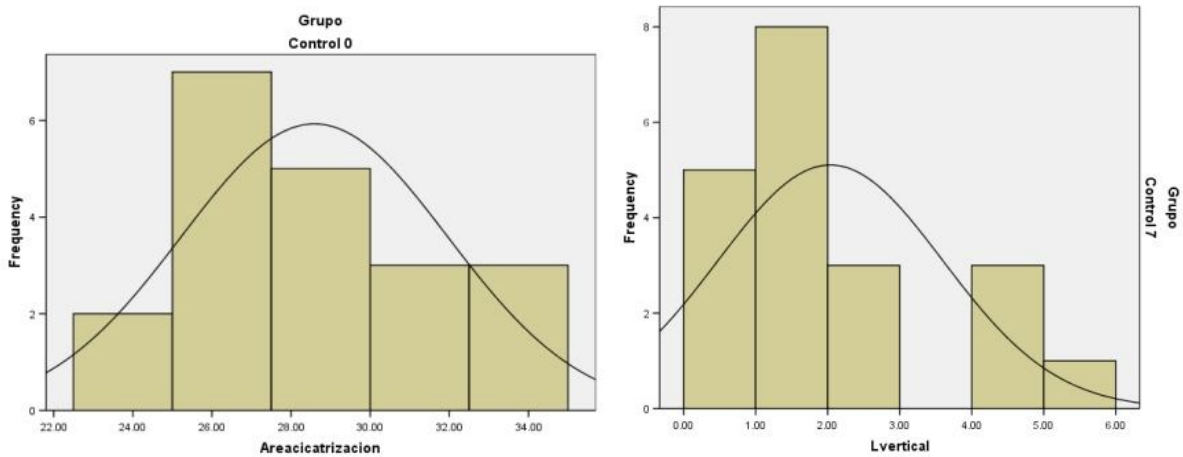


Gráfico 2. Histogramas para área de cicatrización control día 0 y longitud vertical control día 7.

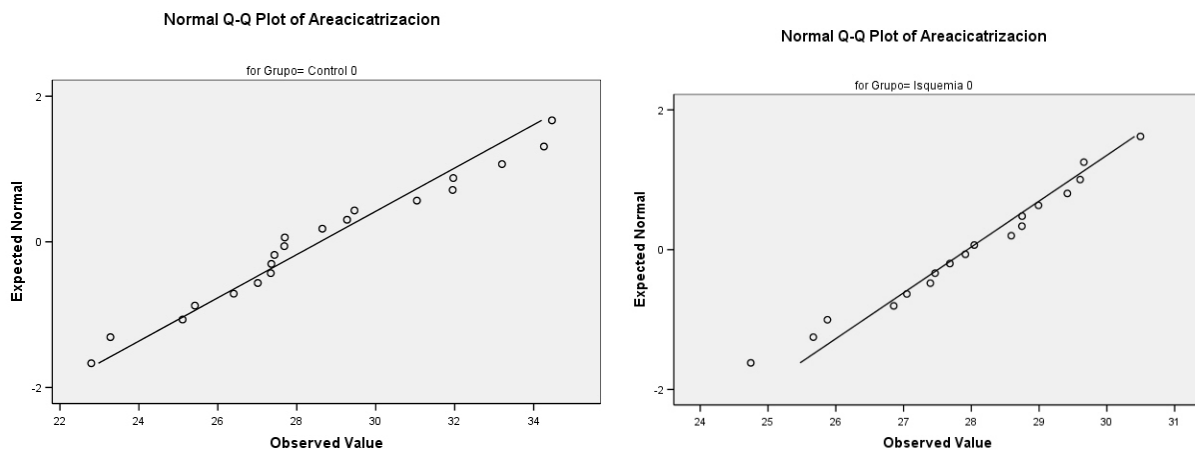
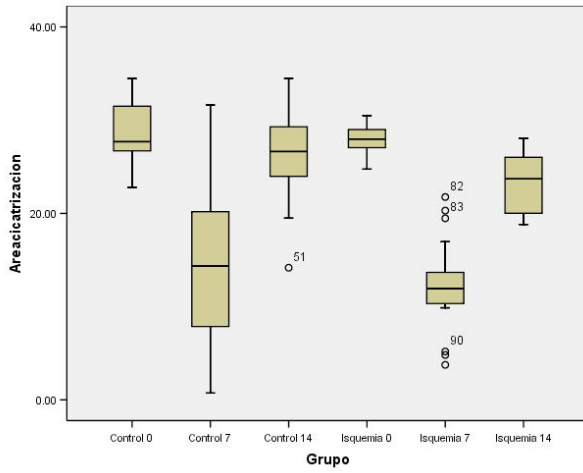


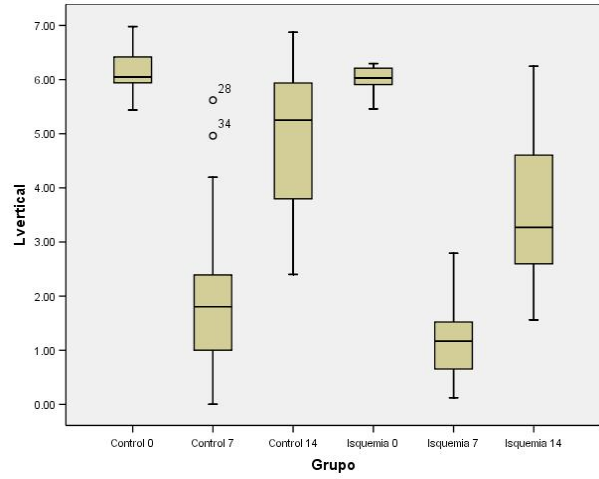
Gráfico 3. Regresión lineal para el área inicial de las úlceras al día 0. En esta gráfica se observa una distribución normal del área inicial de úlceras.

A continuación se presentan los Gráficos Box Plot de cada variable:

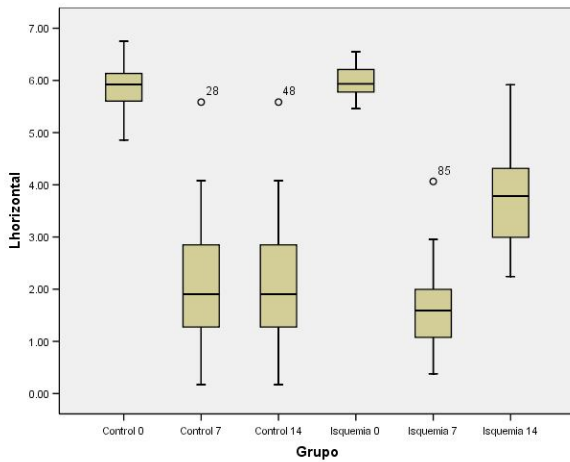
A. Área



B. Longitud Vertical



C. Longitud horizontal



D. Velocidad de cicatrización (área/día)

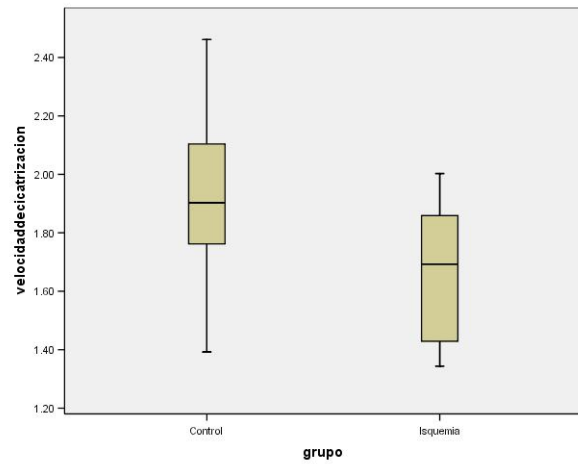


Grafico 4. Se observan las gráficos box plot para las diferentes variables: A) Área; B) Longitud Vertical; C) Longitud Horizontal; D) Velocidad de cicatrización.

En segundo lugar se verificaron los coeficientes de forma, observando que todos los grupos presentan forma simétrica y mesocúrticas aplicando la siguiente fórmula: $g < 2 \times \text{Error típico de } g$, como se observa en el anexo 5.

En tercer lugar se realizaron los test de Kolmogorov-Smirnov(a) y Shapiro-Wilk obteniéndose los siguientes resultados:

Mediciones Iniciales (Día 0)					
Grupo		N	Media (mm)	Kolmogorov-Smirnov(a) (Sig.)	Shapiro-Wilk (Sig.)
Control	Longitud Vertical	20	6.15	.200	.554
	Longitud Horizontal	20	5.84	.200	.516
	Área	20	28.58	.200	.534
Isquemia	Longitud Vertical	18	6.00	.200	.096
	Longitud Horizontal	18	5.97	.200	.600
	Área	18	27.94	.200	.883

Tabla 5. Test de Kolmogorov-Smirnov(a) y Shapiro-Wilk para área y longitud vertical y horizontal, en ambos grupos al día 0.

Longitud de cicatrización Vertical					
Grupo		N	Media (mm)	Kolmogorov-Smirnov(a) (Sig.)	Shapiro-Wilk (Sig.)
Control	7	20	2.03	.030	.038
	14	20	4.95	.195	.109
Isquemia	7	18	1.17	.200	.701
	14	18	3.57	.158	.151

Tabla 6. Test de Kolmogorov-Smirnov(a) y Shapiro-Wilk para longitud vertical de cicatrización, en ambos grupos los días 7 y 14.

Longitud de cicatrización Horizontal					
Grupo		N	Media (mm)	Kolmogorov-Smirnov(a) (Sig.)	Shapiro-Wilk (Sig.)
Control	7	20	2.11	.200	.249
	14	20	4.74	.126	.212
Isquemia	7	18	1.66	.172	.197
	14	18	3.80	.200	.188

Tabla 7. Test de Kolmogorov-Smirnov(a) y Shapiro-Wilk para longitud horizontal de cicatrización, en ambos grupos los días 7 y 14.

Área de cicatrización					
Grupo		N	Media (mm)	Kolmogorov-Smirnov(a) (Sig.)	Shapiro-Wilk (Sig.)
Control	7	20	14.55	.200	.984
	14	20	26.37	.200	.598
Isquemia	7	18	12.37	.147	.320
	14	18	23.53	.200	.152

Tabla 8. Test de Kolmogorov-Smirnov(a) y Shapiro-Wilk para área de cicatrización, en ambos grupos los días 7 y 14.

Como se puede observar todas las variables presentan una distribución normal ($p > 0.05$), excepto la longitud vertical del día 7 en el grupo control ($p < 0.05$). La significancia para los valores obtenidos el día 0 nos muestra que no hay diferencia relevante en el área inicial ni en las longitudes verticales y horizontales iniciales de las úlceras, ayudando a la validación del método quirúrgico.

Velocidad de cicatrización (mm ² /día)				
Grupo	N	Media (mm ² /día)	Kolmogorov-Smirnov(a) (Sig.)	Shapiro-Wilk (Sig.)
Control	18	1.92	.200	.969
Isquemia	18	1.68	.200	.151

Tabla 9. Test de Kolmogorov-Smirnov(a) y Shapiro-Wilk para la velocidad de cicatrización para el día 14.

Se puede observar que ambos grupos presentan una distribución normal ($p > 0.05$).

Resultados de pruebas paramétricas y no paramétricas

Al encontrarse normalidad en la distribución de las variables antes mencionadas, se utilizó la prueba T de Student para comparar los resultados entre los siguientes grupos:

Variable	Grupos	Significancia de Leven's	Df	F	Sig. (doble cola)
Longitud Vertical	Control 0 e isquemia 0	0.95	36	2.943	.164
Longitud horizontal	Control 0 e isquemia 0	.219	36	1.563	.339
Área	Control 0 e isquemia 0	.050	36	9.141	.459
Longitud de cicatrización vertical	Control 14 e isquemia 14	.461	36	.556	.003
Longitud de cicatrización horizontal	Entre control 7 e isquemia 7	.191	36	1.77	.237
	Entre control 14 e isquemia 14	.163	36	.163	.028

Área de cicatrización	Entre control 7 e isquemia 7	.046	36	4.27	.325
	Entre control 14 e isquemia 14	.256	36	1.33	.036
Velocidad de cicatrización (área/día)	Control 14 e Isquemia 14	.392	34	.752	.006

Tabla 10. Prueba T de Student para Áreas y longitudes originales, áreas y longitudes de cicatrización a los días 7 y 14 y velocidad de cicatrización (mm²/día).

Se puede observar que no existe diferencia significativa al inicio del estudio entre el grupo control y el grupo isquémico y que al día 7 no existe diferencia de cicatrización entre el grupo control y el grupo isquémico ($p > 0.05$), mientras que al día 14 las cuatro mediciones muestran una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo isquémico.

Debido a que el grupo de longitud vertical al día 7 no mostró una distribución normal, se utilizó estadística no paramétrica, específicamente U de Mann-Whitney:

	Lvertical
Mann-Whitney U	118.500
Wilcoxon W	289.500
Z	-1.798
Asymp. Sig. (2-tailed)	.072
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.072(a)

Tabla 11. U de Mann-Whitney para longitud vertical de cicatrización al día 7.

Observándose que al día 7 no hay diferencia significativa entre las longitudes verticales de los grupos control y el isquémico, al igual que con el área de cicatrización y la longitud horizontal de cicatrización, los mismos grupos, el mismo día.

Como dato adicional a los objetivos del presente estudio, se obtuvieron los porcentajes de cicatrización para cada úlcera, y luego se obtuvo el porcentaje de úlceras cicatrizadas en más del 50% para el día 7 y cicatrizadas completamente para el día 14.

Grupo	Cicatrizadas >50%	
	Numero de úlceras	Porcentaje
Control 7 (n=20)	9	45%
Isquemia 7 (n=18)	5	27.7%

Tabla 12. Úlceras Cicatrizadas al menos en un 50% del área inicial, al 7° día.

Grupo	Completamente cicatrizadas	
	Numero de úlceras	Porcentaje
Control 14 (n=20)	7	35%
Isquemia 14 (n=18)	3	16.6%

Tabla 13. Úlceras cicatrizadas completamente al día 14.

No se encontraron úlceras cicatrizadas completamente al día 7 en ninguno de los dos grupos. Para este día, el 45% de los controles estaba cicatrizado en un 50%, mientras que en el grupo isquémico únicamente el 27.7%. Además, para el día 14 se encontró que el 35% de los controles había cicatrizado completamente, mientras que en el grupo isquémico, únicamente el 16.6%.

De las úlceras que habían cicatrizado completamente, para el día 14, se enviaron 4 muestras para análisis histopatológico, sin discriminación por grupo (control e isquémico), con el propósito de verificar que la cicatrización observada por análisis computarizado ocurriera en 3 dimensiones. Se observó presencia de tejido de granulación que cubría toda el área de la úlcera y tejido de epitelización. Además se observó la presencia del cartílago subyacente intacto (fig. 21).

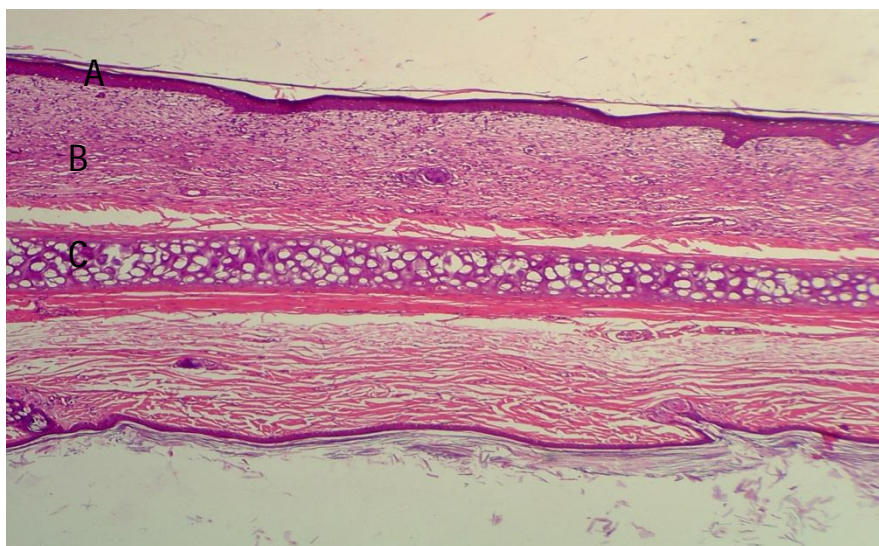


Figura 21. Corte histológico de úlcera con cicatrización completa al día 14. (A) Tejido de epitelización. (B) Tejido de granulación. (C) Cartílago.

Discusión

Para la validación del método se analizaron las áreas iniciales de las úlceras obtenidas por las herramientas de medición "freehand" y puntos múltiples, del programa Image J; encontrando que las mediciones dentro de cada grupo presentaban distribución normal, evidenciado en las gráficas de regresión lineal (Gráfico 1) y confirmado por la prueba de Shapiro-Wilk ($\text{Sig}>0.05$, IC 95%) para ambos grupos (Tabla 3). Además, se compararon entre ellos los resultados obtenidos con las dos herramientas de selección con la prueba T de Student (Tabla 4), demostrando que no existe diferencia estadística significativa entre los valores ($p>0.05$, IC 95%). Esto indica que cualquiera de las dos herramientas de selección puede ser utilizada para el análisis de imágenes digitales. En el presente estudio se eligió la herramienta de freehand por practicidad y la facilidad de contar con la PC "Tablet". Sin embargo, la herramienta de selección por puntos múltiples es válida, precisa y sencilla para utilizarse con el ratón de la computadora.

Al realizar análisis estadístico del área inicial de las úlceras (día 0) se encontró que en el grupo control existe una media 28.58 mm^2 con una $p=0.516$ por Shapiro-Wilk, y el grupo isquémico mostró una media de 27.94 mm^2 con $p=0.883$ por Shapiro-Wilk, indicando que se trata de variables con una distribución normal (Tabla 5). Al comparar estos dos grupos mediante la prueba T de Student, se observa una significancia de doble cola de 0.459 ($p>0.05$, IC 95%) (Tabla 10), por lo que se deduce que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las áreas iniciales. Esta afirmación es fundamental en la reproducción del modelo, pues brinda un punto de partida para la cicatrización y asegura que los resultados no se verán afectados por fallas en la técnica de realización de las heridas. Además, apoya la idea que este modelo puede ser fácilmente reproducible sin la necesidad de capacitación especial sobre la utilización del punch dermatológico.

La habilidad para medir precisamente el tamaño de una úlcera es crítico para la documentación del avance de la cicatrización y evaluar la efectividad de las intervenciones terapéuticas, tanto en la práctica clínica como en la experimentación²⁷. Como se ha mencionado, existen diferentes técnicas para evaluar el tamaño de las úlceras. La técnica de análisis de imágenes digitales es ampliamente aceptada y utilizada en el seguimiento de la cicatrización, ya que ha demostrado ser válida y sensible, además de ser conveniente, rápida, fácil y de bajo costo. Con esta se miden las longitudes horizontales y verticales de las úlceras y/o se realiza análisis computarizado en la que el software específico calcula el área. El

análisis computarizado de las áreas ha demostrado ser más preciso que las mediciones de los diámetros resultantes, del análisis de las longitudes^{32,31}. Al momento existen diferentes programas para el análisis de imágenes digitales de úlceras, algunos siendo altamente costosos. Image J[®] es una herramienta efectiva, gratuita, fácil de utilizar, y que se encuentra disponible para descarga electrónica en internet.

La obtención de las imágenes digitales también puede realizarse de diferentes maneras, cada una con un nivel de complejidad diferente. Las fotografías son utilizadas comúnmente para evaluar morfología macroscópica de lesiones ya que son un método fácil, accesible y no invasivo; pero son altamente subjetivas y pueden llevar a error y ser difíciles de reproducir con las mismas características (ángulo, intensidad de luz, distancia, etc.)^{31,33}. Estudios sobre úlceras gástricas sugieren que la obtención de imágenes por medio de escáner es una alternativa poco costosa y eficiente, ya que no se necesita equipo técnico costoso ni entrenamiento especial, además de presentar imágenes claras y precisas de las lesiones, en menor tiempo y con menor dificultad^{34,33}.

Las medidas de las áreas y de las longitudes verticales y horizontales de las úlceras fueron realizadas con el programa Image J. Como se mencionó anteriormente, las áreas y las longitudes iniciales (día 0) presentaron distribución normal ($p > 0.05$), tanto en el grupo control como en el grupo isquémico, y al compararlas entre ellas no se encontró diferencia estadísticamente significativa, por lo que se puede deducir que las mediciones son precisas y reproducibles (Tablas 5 y 10). Esto indica que la utilización de imágenes digitales y su análisis permiten la obtención de resultados confiables.

Para evaluar la cicatrización de las heridas, se midió el área cicatrizada, que se obtuvo al restarle al área inicial de la úlcera, el área obtenida el día de la evaluación. Las heridas fueron analizadas nuevamente 7 días después del procedimiento, presentando una área de cicatrización media de 14.55 mm², con una $p = 0.984$ por Shapiro-Wilk en el grupo control y una media de 12.37 mm², con una $p = 0.320$ por Shapiro-Wilk en el grupo isquémico; mostrando distribución normal ($p > 0.05$) (Cuadro 8). Al comparar las áreas obtenidas al día 7 entre ambos grupos, mediante la prueba T de Student, se encontró una significancia de doble cola de 0.325 (tabla 10), mostrando que a pesar de encontrar una mayor cicatrización en las úlceras del grupo control, no existen cambios estadísticamente significativos en la cicatrización de las úlceras entre estos grupos ($p > 0.05$, IC 95%).

Según el modelo de Mustoe al día 7 el 50% de las heridas control están completamente epitelializadas, mientras que en el grupo isquémico no se encuentra ninguna epitelializada completamente. Al analizar nuestras imágenes no encontramos ninguna herida epitelializada completamente en ninguno de los dos

grupos. Únicamente, se encontró un 45% de las úlceras control con un área de cicatrización mayor al 50% para el día 7 y un 27.7% para el grupo isquémico. Esta diferencia puede ser atribuida a que Mustoe *et al* utilizan estudios histopatológicos para evaluar la cicatrización, mientras que en este estudio se utilizó planimetría.

El análisis de las imágenes 14 días después del procedimiento muestran un área cicatrización media de 26.37 mm² con una $p=0.598$ para el grupo control y de 23.53 mm² con $p= 0.152$ para el grupo isquémico; presentando distribución estadística normal ($p>0.05$). Al comparar las áreas entre ambos grupos por medio de la prueba T de Student se obtiene una significancia de doble cola de 0.036, indicando una diferencia estadísticamente significativa en la cicatrización ($p<0.05$, IC 95%).

Estos datos muestran una mayor cicatrización en las orejas control que en las orejas isquémicas, atribuible a la disminución de los niveles de oxígeno tisular, secundaria a la ligadura de las arterias principales y la interrupción de la microvasculatura.

Además de las áreas de cicatrización, se midieron las longitudes horizontales y verticales para reforzar la validez del modelo animal, el método de recolección y análisis de imágenes.

Para el día 0 se obtuvieron longitudes horizontales y verticales de la úlcera, con distribución normal ($p>0.05$) como se observa en el cuadro 5, indicando que no existe diferencia relevante en el tamaño original de las lesiones, por lo que se deduce que la técnica quirúrgica es confiable y reproducible. Esto se refuerza al comparar, mediante prueba T de Student, el grupo control con el grupo isquémico, donde se encontraron longitudes similares sin diferencia estadística ($p>0.05$) (Tabla 10).

Las longitudes de cicatrización horizontales en los grupos control e isquémico, en el día 7, no muestran diferencias entre las úlceras del mismo grupo ($p>0.05$) (Tabla 7) ni al compararlas con el grupo contrario (Significancia doble cola= 0.237) (Tabla 10). Con esto se deduce que la cicatrización al día 7 es similar en ambos grupos. Así mismo, las longitudes verticales de cicatrización de úlceras isquémicas presentan una distribución normal (Tabla 6).

Por el contrario, las longitudes de cicatrización verticales del grupo control **presentan diferencia estadística** entre ellas ($p<0.05$) (Tabla 6). Esta diferencia se debe a la presencia de un valor extremo de cicatrización (longitud 4.7mm para día 7). Esta úlcera presentó una cicatrización casi completa para ese día, poniendo en evidencia que pueden existir diferencias de cicatrización entre individuos sanos, no relacionada con las intervenciones; lo cual debe ser tomado en cuenta para investigaciones posteriores

con este modelo. Debido a que no presentaron distribución normal se evaluaron con la prueba U de Mann-whitney (Tabla 11), revelando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (Significancia doble cola 0.072). Con esto se apoya la deducción que al día 7, la cicatrización en el modelo es similar, tanto en las orejas isquémicas como en las controles; a diferencia de lo propuesto por Mustoe.

Las longitudes de cicatrización vertical y horizontal del día 14 muestran distribución normal dentro del grupo (control o isquémico) ($p > 0.05$), pero al analizarlas con la prueba T de Student ambas variables presentan diferencia estadísticamente significativa (Significancia doble cola 0.003 y 0.028 respectivamente) (Tabla 10). Estos datos muestran que la cicatrización es mayor en las orejas control que en las orejas isquémicas, indicando que el modelo ha logrado reproducir niveles bajos de oxígeno tisular en las orejas sometidas a ligadura vascular.

Las velocidades de cicatrización fue sometida a pruebas de normalidad demostrando una $p = 0.969$ para el grupo control y $p = 0.151$ para el grupo isquémico, mostrando una distribución normal. Al comparar los grupos por medio de la prueba T de Student se encontró una media para el grupo control de $1.92 \text{ mm}^2/\text{día}$ y para el grupo isquémico de $1.68 \text{ mm}^2/\text{día}$, con una significancia de doble cola de 0.006, indicando que existe diferencia significativa entre la velocidad de cicatrización del grupo control con el isquémico. Esta diferencia de velocidad de cicatrización se le atribuye a la isquemia inducida por la ligadura vascular.

Con los datos anteriores se puede decir que se ha reproducido un modelo de úlceras isquémicas, evidenciado por un área de cicatrización y longitudes de cicatrización horizontal y vertical en el día 14 menores en las orejas sometidas a ligadura vascular. Se han encontrado diferencias con el modelo propuesto por Mustoe *et al.* en los resultados del día 7 en cuanto a la cicatrización. Es importante destacar que Mustoe en su modelo evalúa la cicatrización utilizando análisis histopatológico y no análisis por planimetría.

Estudio Histopatológico

Las muestras tomadas para la validación de la técnica quirúrgica, inmediatamente después de realizadas las lesiones (día 0), mostraron que la lesión abarcaba toda la profundidad de la dermis sin lesionar el cartílago subyacente y la ausencia de pericondrio. Esto garantizó que las heridas se encontraban sobre

una base avascular y, por ende, que la cicatrización ocurrió de la periferia hacia el centro y no de la base de la herida a la periferia.

Los resultados del estudio histopatológico de las muestras tomadas el día 14 mostraron la presencia de tejido de epitelización y tejido de granulación que abarcaban la totalidad de la herida. Cabe destacar que se demostró la integridad del cartílago subyacente. Con estos datos se confirma la cicatrización total de la úlcera, observada por medio del análisis de las imágenes.

Reproducción del modelo de úlceras en orejas de conejo

Anatomía

En la literatura se muestra que la oreja del conejo consta de 3 arterias principales que le dan su irrigación, la Arteria central, rostral y marginal; y corren junto con la vena correspondiente. Sin embargo, se encontró una variación anatómica en relación a la anatomía descrita por Mustoe²⁰. Las Arterias centrales viajan acompañadas de una vena y nervio, encontrándose posteriores a la vena acompañante, como se muestra en la figura 17. Esta relación no se encontró descrita en la literatura y nos parece de suma importancia para la exploración vascular y reproducción posterior del modelo.

Conclusiones

- El modelo de úlceras isquémicas en orejas de conejo es reproducible sin necesidad de capacitación especial.
- La reproducción de este modelo tiene cierto grado de complejidad, pero una vez se conoce el procedimiento es fácil de reproducir. Alcanzar una anestesia profunda es esencial para garantizar el bienestar del sujeto de experimentación.
- Al día 7 no se encuentra diferencia estadísticamente significativa de la cicatrización entre el grupo control y el grupo isquémico.
- Al día 14 se encuentra una diferencia estadísticamente significativa del área de cicatrización entre el grupo control y el grupo isquémico.
- Las úlceras de las orejas sometidas a ligadura vascular sanan más lento que las úlceras de las orejas control.
- Se encontró una variante anatómica del modelo propuesto por Muestoe, se observó que las arterias centrales viajan acompañadas de una vena y nervio, encontrándose posteriores a la misma.
- El método de obtención de imágenes digitales por medio de un escáner es una alternativa eficiente, práctica e innovadora en el estudio de cicatrización de úlceras experimentales.
- El análisis de las imágenes digitales de úlceras por medio del programa Image J es costo efectiva.
- Este modelo puede utilizarse para evaluar el efecto de diferentes alternativas terapéuticas sobre la cicatrización de úlceras isquémicas y lesiones de la piel en condiciones normales.

Recomendaciones

- Utilizar conejos machos con peso mayor de 3.5 kilogramos, para asegurar un buen tamaño de la oreja y mejor visualización de los vasos sanguíneos.
- Evitar el uso de tinta china para delimitar los bordes iniciales de las heridas, ya que colorea el centro de la lesión y podría dificultar el análisis digital inicial. Además, el borde de la herida es fácilmente identificable, y se observó que entre el tercer y cuarto día la coloración de la tinta había desaparecido completamente.
- Al momento de obtener imágenes para estudiar este modelo, hacerlo por medio del uso de un escáner, realizar su análisis con el método de calibración propuesto y utilizar la herramienta de selección "freehand" para calcular el área de las úlceras.
- Antes de digitalizar las imágenes de las úlceras utilizando un escáner, debe asegurarse de secar completamente las úlceras, de no hacerlo las secreciones dificultan el análisis digital posterior. Por otra parte, como las imágenes son analizadas en blanco y negro, la presencia de sangre puede enmascarar el borde de la herida.
- Utilizar el collarín canino durante todo el tiempo de observación de los animales, para evitar la remoción del Tegaderm® de las úlceras.
- Asegurarse de que las úlceras permanezcan cubiertas todo el tiempo con Tegaderm® y reemplazarlo en caso de ser necesario, ya que de esto depende que la cicatrización de las úlceras sea bajo las mismas condiciones y la reproducción final del modelo.
- Realizar estudios histológicos al día 7 y 14, tanto en el grupo control, como en el isquémico, para evaluar el área de tejido de granulación y epitelización y compararlo con los resultados obtenidos por Muestoe *et al.*

- Utilizar este modelo para evaluar el efecto de extractos de plantas comúnmente utilizadas en nuestro país, sobre la cicatrización de úlceras isquémicas, tomando en cuenta la variación anatómica descrita previamente.

ANEXOS

ANEXO 1. Anestésicos utilizados

Conejo	Peso (Kg)	Ketamina al 10% (mg)	Ketamina (ml)	Xilacina (mg)	Xilacina al 2% (ml)
1	3.4	204	2.0	17	0.9
2	3.1	186	1.9	15.5	0.8
3	3.3	198	2.0	16.5	0.8
4	3.3	198	2.0	16.5	0.8
5	3.2	192	1.9	16	0.8

Anexo 1. Uso de anestésicos. Se muestra el peso de cada conejo y la cantidad de anestésico utilizado por kilogramo.

ANEXO 2. Datos obtenidos sobre Área, Longitud vertical y longitud horizontal durante el ensayo quirúrgico.

OREJA	DIA	CUADRANTE	AREA (mm ²)	AREA (mm ²)	LONGITUD VERTICAL (mm)	LONGITUD HORIZONTAL (mm)
DERECHA	0	A	27.048	26.081	6.125	6.081
		B	28.589	27.579	5.797	6.092
		C	24.746	25.746	5.458	5.643
		D	28.991	27.913	6.383	5.783
IZQUIERDA	0	A	26.104	25.216	5.97	5.437
		B	23.878	23.458	5.334	5.809
		C	30.273	29.734	5.937	6.278
		D	27.582	27.012	5.292	6.459
DERECHA	7	A	23.293	22.693	5.959	5.004
		B	17.349	16.847	5.15	4.236
		C	19.935	18.365	5.015	5.207
		D	15.32	14.362	4.578	4.261
IZQUIERDA	7	A	4.686	4.396	1.891	4.66
		B	16.48	15.875	4.178	4.201
		C	19.781	18.901	3.954	5.463
		D	24.09	23.839	3.877	5.2
DERECHA	14	A	1.026	1.826	0.854	2.276
		B	9.548	9.058	3.554	3.258
		C	5.934	4.324	2.575	3.691
		D	3.265	2.805	3.265	3.186
IZQUIERDA	14	A	0.127	0.417	0.163	0.598
		B	0	0	0	0
		C	1.682	1.829	2.054	1.043
		D	2.342	1.937	2.083	1.198

Anexo 2. Uso de anestésicos.

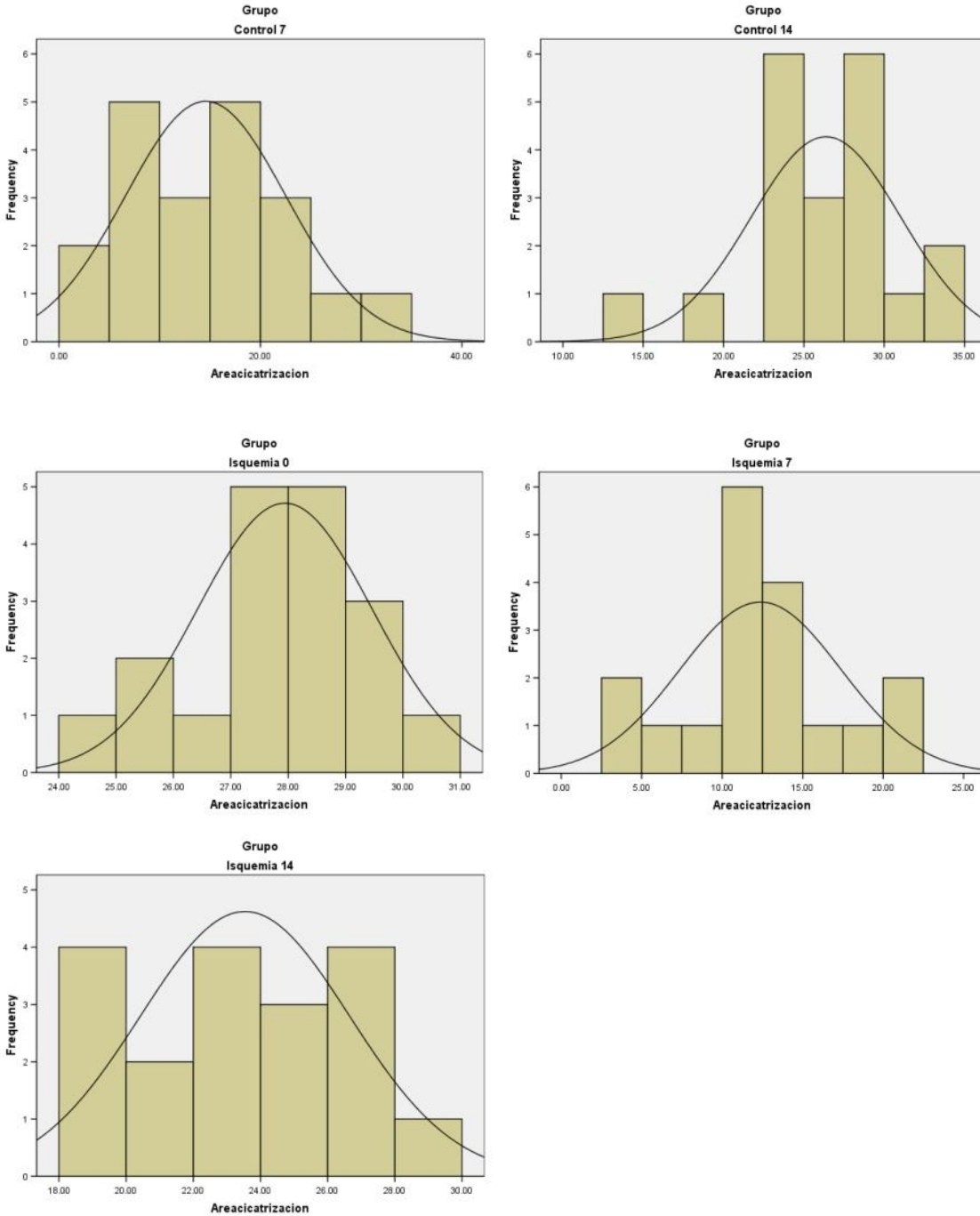
ANEXO 3. Área obtenida según método de selección

ÁREA OBTENIDA SEGÚN METODO DE SELECCIÓN				
Conejo	Oreja	Cuadrante	Puntos Multiples (mm ²)	Freehand (mm ²)
1	DERECHA	A	26.855	25.877
		C	29.761	28.749
		D	26.965	27.048
2	DERECHA	A	29.121	28.043
		B	28.339	27.465
		C	31.745	30.495
		D	30.152	29.417
3	DERECHA	A	26.137	26.855
		B	25.871	25.668
		D	28.846	29.605
4	DERECHA	A	28.215	28.589
		B	28.339	27.683
		C	25.856	24.746
		D	28.98	28.746
5	DERECHA	A	29.641	27.912
		B	33.857	29.666
		C	30.777	29.991
		D	31.748	27.395
1	IZQUIERDA	A	32.865	34.464
		B	27.777	27.683
		C	28.074	27.012
		D	32.864	33.198
2	IZQUIERDA	A	27.746	25.106
		B	28.163	25.418
		C	29.465	27.34
		D	30.851	31.964
3	IZQUIERDA	A	29.043	27.433
		B	30.715	31.042
		C	33.698	31.948
		D	25.074	23.278
4	IZQUIERDA	A	25.559	26.402
		B	32.856	34.26
		C	25.637	27.355
		D	24.731	22.793
5	IZQUIERDA	A	34.853	28.647
		B	28.496	29.461
		C	28.475	29.273
		D	25.387	27.696

Anexo 3. Áreas obtenidas según herramienta de selección. Se muestran áreas según herramienta de selección puntos múltiples y "freehand" utilizados en la validación del modelo.

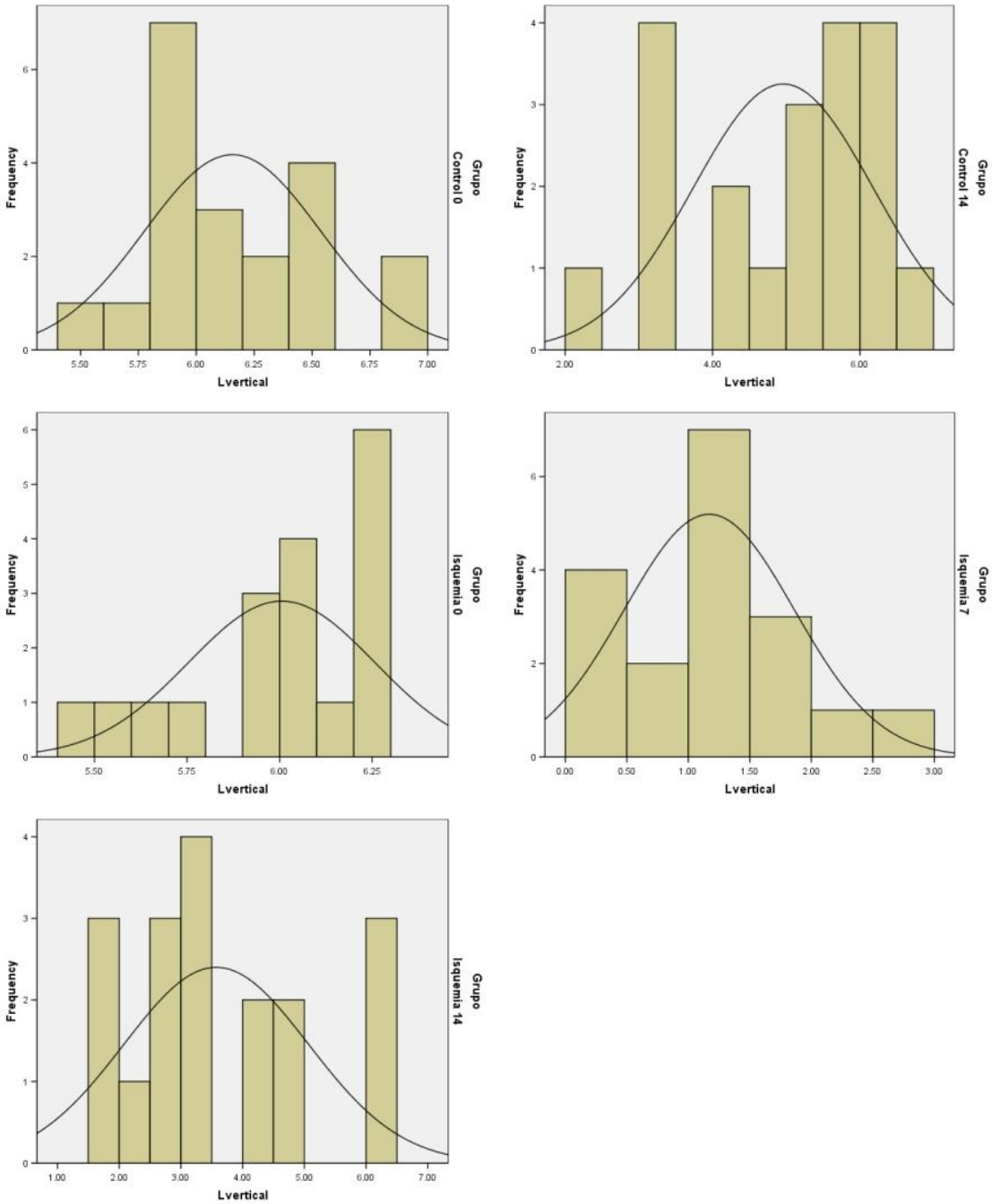
ANEXO 4. Histogramas para área, longitud vertical y longitud horizontal de los grupos control y grupos isquémicos a los días 0,7 y 14.

A) Histogramas para áreas de úlceras



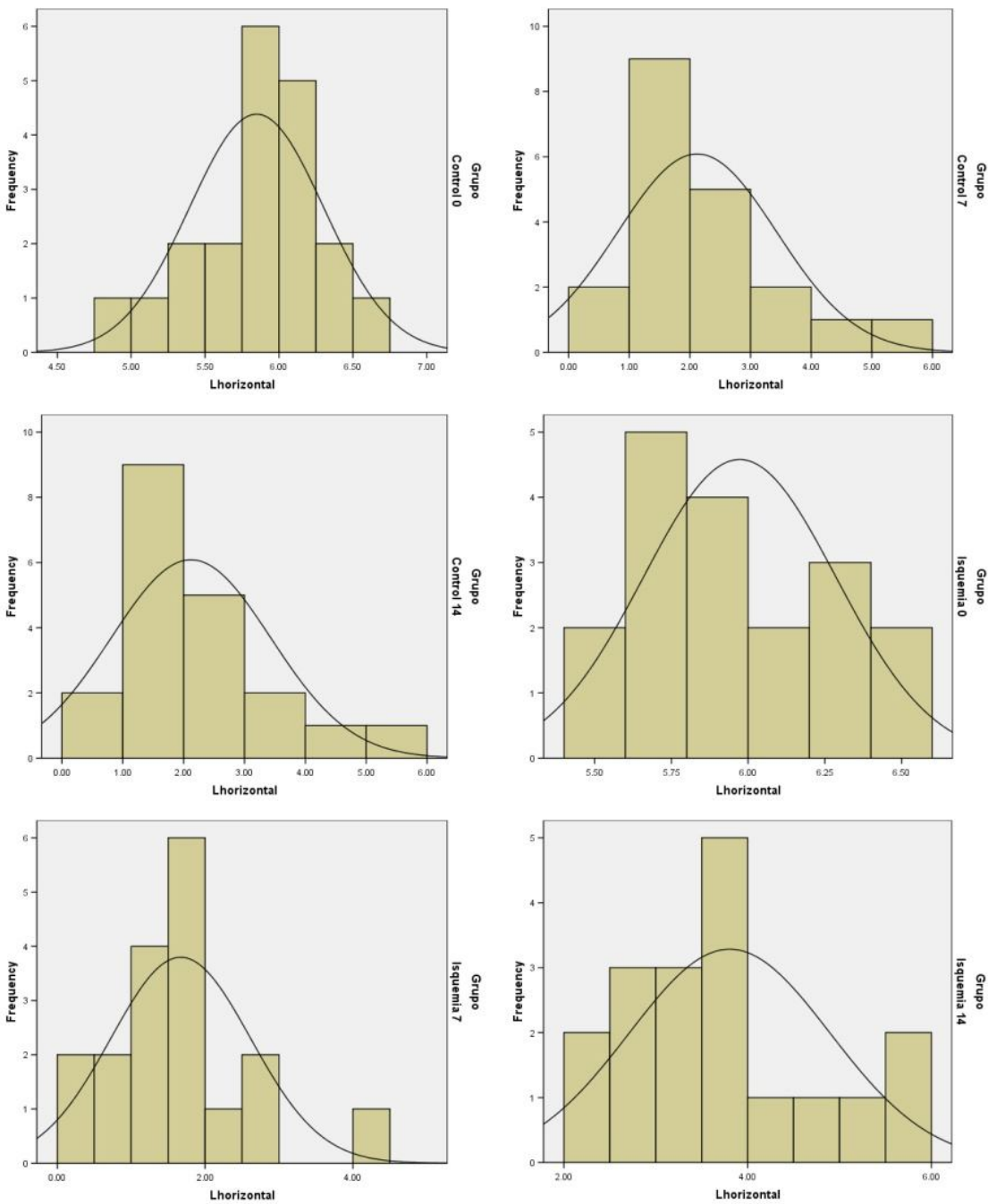
Anexo 4. A). Histogramas para áreas de úlceras. Se muestran los histogramas para las mediciones de áreas utilizando la herramienta de selección "freehand" al día 0, 7 y 14 con distribución normal.

B) Histogramas para longitud vertical de las úlceras



Anexo 4. B). Histogramas para longitud vertical de úlceras. Se muestran los histogramas para las mediciones longitud vertical de las úlceras al día 0, 7 y 14 con distribución normal.

C) Histogramas para áreas de úlceras



Anexo 4.C). Histogramas para longitud horizontal de úlceras. Se muestran los histogramas para las mediciones longitud horizontal de las úlceras al día 0, 7 y 14 con distribución normal.

ANEXO 5. Coeficientes de forma para las áreas y longitudes iniciales (día 0) y las áreas y longitudes de cicatrización (día 7 y 14).

Grupo			(g)	Error Típico	$g < 2 \times \text{Error típico}$
Control	Día 0	Asimetría	.208	.512	1.024
		Curtosis	-.620	.992	1.984
	Día 7	Asimetría	.226	.512	1.024
		Curtosis	-.311	.992	1.984
	Día 14	Asimetría	-.688	.512	1.024
		Curtosis	1.347	.992	1.984
Isquemia	Día 0	Asimetría	-.438	.536	1.072
		Curtosis	-.234	1.038	2.076
	Día 7	Asimetría	.160	.536	1.072
		Curtosis	-.108	1.038	2.076
	Día 14	Asimetría	-.219	.536	1.072
		Curtosis	-1.038	1.038	2.076
Longitud Vertical					
Grupo			(g)	Error Típico	$g < 2 \times \text{Error típico}$
Control	Día 0	Asimetría	.444	.512	1.024
		Curtosis	.271	.992	1.984
	Día 7	Asimetría	.954	.512	1.024
		Curtosis	.382	.992	1.984
	Día 14	Asimetría	-.523	.512	1.024
		Curtosis	-.795	.992	1.984
Isquemia	Día 0	Asimetría	-.820	.536	1.072
		Curtosis	-.173	1.038	2.076
	Día 7	Asimetría	.478	.536	1.072
		Curtosis	.386	1.038	2.076
	Día 14	Asimetría	.583	.536	1.072
		Curtosis	-.585	1.038	2.076
Longitud Horizontal					
Grupo			(g)	Error Típico	$g < 2 \times \text{Error típico}$
Control	Día 0	Asimetría	-.499	.512	1.024
		Curtosis	.363	.992	1.984
	Día 7	Asimetría	.930	.512	1.024
		Curtosis	1.266	.992	1.984
	Día 14	Asimetría	.930	.512	1.024
		Curtosis	1.266	.992	1.984
Isquemia	Día 0	Asimetría	.338	.536	1.072
		Curtosis	-.471	1.038	2.076
	Día 7	Asimetría	.696	.536	1.072
		Curtosis	1.125	1.038	2.076
	Día 14	Asimetría	.692	.536	1.072
		Curtosis	-.299	1.038	2.076

Anexo 5. Coeficientes de forma para las áreas y longitudes iniciales (día 0) y las áreas y longitudes de cicatrización (día 7 y 14). Se observan que todos los grupos presentan una forma simétrica y mesocrtica ($g < 2 \times \text{Error típico}$).

ANEXO 6. Resultado de áreas.

AREA								
Conejo	Oreja	Cuadrante	Área día 0 (mm)	Área día 7 (mm)	Área día 14 (mm)	Área de cicatrización día 7 (mm)	Área de cicatrización día 14(mm)	% de cicatrización total
1	DERECHA	A	25.877	12.514	0	13.363	25.88	100
		C	28.749	18.419	5.01	10.33	23.74	82.57
		D	27.048	23.293	1.026	3.755	26.02	96.21
2	DERECHA	A	28.043	6.288	0	21.755	28.04	100
		B	27.465	7.995	4.653	19.47	22.81	83.06
		C	30.495	10.196	2.989	20.299	27.51	90.2
		D	29.417	12.463	7.859	16.954	21.56	73.28
3	DERECHA	A	26.855	13.451	0	13.404	26.86	100
		B	25.668	13.644	6.129	12.024	19.54	76.12
		D	29.605	18.743	6.476	10.862	23.13	78.13
4	DERECHA	A	28.589	17.349	9.548	11.24	19.04	66.6
		B	27.683	22.498	2.91	5.185	24.77	89.49
		C	24.746	19.935	5.934	4.811	18.81	76.02
		D	28.746	17.714	8.737	11.032	20.01	69.61
5	DERECHA	A	27.912	16.089	4.248	11.823	23.66	84.78
		B	29.66	16.74	2.964	12.92	26.7	90.01
		C	28.991	15.32	3.265	13.671	25.73	88.74
		D	27.395	17.521	7.517	9.874	19.88	72.56
1	IZQUIERDA	A	34.464	18.216	0	16.248	34.46	100
		B	27.683	14.576	0	13.107	27.68	100
		C	27.012	24.09	2.342	2.922	24.67	91.33
		D	33.198	19.606	3.419	13.592	29.78	89.7
2	IZQUIERDA	A	25.106	4.686	0.127	20.42	24.98	89.7
		B	25.418	7.843	0	17.575	25.42	100
		C	27.34	10.358	1.497	16.982	25.84	94.52
		D	31.964	0.344	0.111	31.62	31.85	99.65
3	IZQUIERDA	A	27.433	7.494	0	19.939	27.43	100
		B	31.042	5.42	1.925	25.622	29.12	93.8
		C	31.948	24.298	17.777	7.65	14.17	44.36
		D	23.278	16.48	0	6.798	23.28	100

Anexo 6. Resultados de áreas. Se muestran los resultados de medición de área de la totalidad de las úlceras.

AREA								
Conejo	Oreja	Cuadrante	Área día 0 (mm)	Área día 7 (mm)	Área día 14 (mm)	Área de cicatrización día 7 (mm)	Área de cicatrización día 14(mm)	% de cicatrización total
4	IZQUIERDA	A	26.402	18.316	3.159	8.086	23.24	88.03
		B	34.26	10.402	1.391	23.858	32.87	95.94
		C	27.355	20.816	4.757	6.539	22.6	82.61
		D	22.793	22.064	3.302	0.729	19.49	85.51
5	IZQUIERDA	A	28.647	15.48	0	13.167	28.65	100
		B	29.461	7.803	0	21.658	29.46	100
		C	29.273	19.781	1.682	9.492	27.59	94.25
		D	27.696	12.531	2.807	15.165	24.89	89.86

Anexo 6. Resultados de áreas. Se muestran los resultados de medición de área de la totalidad de las úlceras.

ANEXO 7. Resultados de longitud vertical.

LONGITUD VERTICAL								
Conejo	Oreja	Cuadrante	Longitud vertical día 0 (mm)	Longitud vertical día 7 (mm)	Longitud vertical día 14 (mm)	Longitud de cicatrización día 7 (mm)	Longitud de cicatrización día 14(mm)	% de cicatrización total
1	DERECHA	A	6.247	4.196	0	2.051	6.247	100.00
		C	6.247	5.87	4.665	0.377	1.582	25.32
		D	6.125	5.959	0.854	0.166	5.271	86.06
2	DERECHA	A	6.173	5.038	0	1.135	6.173	100.00
		B	6.003	3.212	2.713	2.791	3.29	54.81
		C	6.292	5.011	1.632	1.281	4.66	74.06
		D	6.211	5.275	2.874	0.936	3.337	53.73
3	DERECHA	A	6.046	4.221	0	1.825	6.046	100.00
		B	5.591	4.217	3.349	1.374	2.242	40.10
		D	6.296	6.173	2.124	0.123	4.172	66.26
4	DERECHA	A	6.092	4.236	3.258	1.856	2.834	46.52
		B	5.917	4.722	2.78	1.195	3.137	53.02
		C	5.643	5.207	3.691	0.436	1.952	34.59
		D	6.208	5.187	4.645	1.021	1.563	25.18
5	DERECHA	A	5.972	4.689	1.964	1.283	4.008	67.11
		B	6.0125	4.975	2.764	1.0375	3.2485	54.03
		C	5.783	4.261	3.186	1.522	2.597	44.91
		D	5.908	5.254	3.289	0.654	2.619	44.33

Anexo 7. Resultados de longitud vertical. Se muestran los resultados de medición de longitud vertical de la totalidad de las úlceras. Continúa en la siguiente página.

LONGITUD VERTICAL								
Conejo	Oreja	Cuadrante	Longitud vertical día 0 (mm)	Longitud vertical día 7 (mm)	Longitud vertical día 14 (mm)	Longitud de cicatrización día 7 (mm)	Longitud de cicatrización día 14(mm)	% de cicatrización total
1	IZQUIERDA	A	6.874	5.688	0	1.186	6.874	100
		B	6	3.579	0	2.421	6	100
		C	6.459	5.2	1.198	1.259	5.261	81.45
		D	6.416	4.652	2.927	1.764	3.489	54.38
2	IZQUIERDA	A	5.437	4.66	0.598	0.777	4.839	89
		B	5.637	3.595	0	2.042	5.637	100
		C	6.127	4.228	2.022	1.899	4.105	67
		D	6.481	0.858	0.298	5.623	6.183	95.4
3	IZQUIERDA	A	5.875	4.074	0	1.801	5.875	100
		B	6.421	2.226	1.365	4.195	5.056	78.74
		C	6.375	4.013	3.975	2.362	2.4	37.65
		D	5.809	4.201	0	1.608	5.809	100
4	IZQUIERDA	A	5.958	4.147	2.522	1.811	3.436	57.67
		B	6.98	2.017	1.141	4.963	5.839	83.65
		C	6	5.999	2.549	0.001	3.451	57.52
		D	5.923	5.8	2.48	0.123	3.443	58.13
5	IZQUIERDA	A	6.034	4.147	0	1.887	6.034	100
		B	6.065	2.017	0	4.048	6.065	100
		C	6.278	5.463	1.043	0.815	5.235	83.39
		D	5.983	5.8	1.836	0.183	4.147	69.31

Anexo 7. Resultados de longitud vertical. Se muestran los resultados de medición de longitud vertical de la totalidad de las úlceras.

ANEXO 8. Resultados de longitud horizontal.

LONGITUD HORIZONTAL								
Conejo	Oreja	Cuadrante	Longitud vertical día 0 (mm)	Longitud vertical día 7 (mm)	Longitud vertical día 14 (mm)	Longitud de cicatrización día 7 (mm)	Longitud de cicatrización día 14(mm)	% de cicatrización total
1	DERECHA	A	5.497	3.889	0	1.608	5.497	100.00
		C	5.955	4.792	1.992	1.163	3.963	66.55
		D	6.081	5.004	2.276	1.077	3.805	62.57

Anexo 8. Resultados de longitud horizontal. Se muestran los resultados de medición de longitud horizontal de la totalidad de las úlceras. Continúa en la siguiente página.

LONGITUD HORIZONTAL								
Conejo	Oreja	Cuadrante	Longitud vertical día 0 (mm)	Longitud vertical día 7 (mm)	Longitud vertical día 14 (mm)	Longitud de cicatrización día 7 (mm)	Longitud de cicatrización día 14(mm)	% de cicatrización tota
2	DERECHA	A	5.916	2.965	0	2.951	5.916	100
		B	5.75	3.367	1.843	2.383	3.907	67.95
		C	6.5	3.565	1.798	2.935	4.702	72.34
		D	6.21	2.145	3.743	4.065	2.467	39.73
3	DERECHA	A	5.792	4.333	0	1.459	5.792	100
		B	6.007	4.354	2.251	1.653	3.756	62.53
		D	6.55	6.17	2.704	0.38	3.846	58.72
4	DERECHA	A	5.797	5.15	3.554	0.647	2.243	38.69
		B	5.777	4.882	1.463	0.895	4.314	74.68
		C	5.458	5.015	2.575	0.443	2.883	52.82
		D	5.696	4.345	2.954	1.351	2.742	48.14
5	DERECHA	A	5.951	4.369	2.754	1.582	3.197	53.72
		B	6.281	4.285	2.964	1.996	3.317	52.81
		C	6.383	4.578	3.265	1.805	3.118	48.85
		D	5.904	4.246	2.91	1.658	2.994	50.71
1	IZQUIERDA	A	6.75	4.585	0	2.165	6.75	100
		B	6.083	3.541	0	2.542	6.083	100
		C	5.292	3.877	2.083	1.415	3.209	60.64
		D	6.291	4.761	1.547	1.53	4.744	75.41
2	IZQUIERDA	A	5.97	1.891	0.163	4.079	5.807	97.27
		B	6.065	2.467	0	3.598	6.065	100
		C	5.812	2.968	0.813	2.844	4.999	86.01
		D	6.195	0.61	0.339	5.585	5.856	94.53
3	IZQUIERDA	A	5.791	2.937	0	2.854	5.791	100
		B	5.541	3.714	1.436	1.827	4.105	74.08
		C	6.291	4.905	4.759	1.386	1.532	24.35
		D	5.334	4.178	0	1.156	5.334	100
4	IZQUIERDA	A	5.047	4.828	1.585	0.219	3.462	68.6
		B	5.916	3.659	0.976	2.257	4.94	83.5
		C	5.666	4.581	1.951	1.085	3.715	65.57
		D	4.859	4.688	2.363	0.171	2.496	51.37
5	IZQUIERDA	A	6.045	4.753	0	1.292	6.045	100
		B	6.185	4.926	0	1.259	6.185	100
		C	5.937	3.954	2.054	1.983	3.883	65.4
		D	5.894	2.751	1.947	3.143	3.947	66.97

Anexo 8. Resultados de longitud horizontal. Se muestran los resultados de medición de longitud vertical de la totalidad de las úlceras.

ANEXO 9. Cronograma

MES ACTIVIDAD	ENERO 2010	FEBRERO 2010	MARZO 2010	ABRIL 2010	MAYO 2010	JUNIO 2010	JULIO 2010	AGOSTO 2010	SEPTIEMBRE 2010	OCTUBRE 2010	NOVIEMBRE 2010	DICIEMBRE 2010	ENERO 2011	FEBRERO 2011
Desarrollo de Protocolo														
Entrega de solicitud de asesor.														
Prueba piloto														
Entrega de protocolo a comité de tesis.														
Resolución de comité de tesis														
Modificaciones de protocolo.														
Actividades de gestión de insumos														
Actividades de adquisición de insumos														
Realización de experimentos														
Obtención de resultados														
Tabulación de resultados														
Análisis de resultados														
Redacción de tesis														
Entrega de Tesis														
Defensa de tesis														

ANEXO 10. Materiales y Presupuesto

Tabla 3. Materiales a utilizar en la reproducción del modelo, con precio unitario y total.

No.	Ítem	Cant.	Unidad	P. Unitario	P. Total
1	Conejos	10	c/u	\$11	\$88.00
2	Jaula	3	c/u	\$35.00	\$105.00
3	Alimento	30	Lbs.	\$1.00	\$30.00
4	Guantes	2	Ciento	\$6.86	\$13.72
5	Guantes Estériles	1	Caja	\$21.00	\$21.00
6	Jeringas 3cc	100	c/u	\$0.12	\$12.00
7	Hoja de Bisturí N° 15	10	c/u	\$0.60	\$6.00
8	Campos Quirúrgicos	16	c/u	\$1.50	\$24.00
9	Nylon 5.0	10	c/u	\$1.00	\$10.00
10	Punch para biopsia de 6mm	8	c/u	\$9.00	\$72.00
11	Tinta China	1	Fco.	\$2.95	\$2.95
12	Collarines caninos	8	c/u	\$1.00	\$8.00
13	Tegaderm	35	c/u	\$0.89	\$31.15
14	Rasuradoras	20	c/u	\$0.17	\$3.4
15	Crema depilatoria	2	c/u	\$6.50	\$13.00
16	Jabón yodado	2	500ml	\$3.96	\$7.92
17	Gasas estériles	1	ciento	\$4.38	\$ 4.38
18	Formalina al 10%	1	Litro	\$16.95	\$16.95
19	Agua Destilada	1	Litro	\$2.54	\$2.54
20	Vaselina	1	C/u	\$4.00	\$4.00
21	SSN	2	1000 ml	\$8.83	\$17.66
22	Ketamina	15	Vial 50mg/ml	\$7.70	\$115.50
23	Xilacina	15	Vial	\$6.85	\$102.75
27	Papelería (Hoja tamaño carta, Papel Bond)	2	Resmas	\$3.75	\$7.50
28	Impresiones	2	Cartuchos de Tinta	\$12	\$24
29	Viáticos	-	-	-	\$300
30	Transporte (Gasolina)	50	Galones	\$2.57 c/Galón	\$128.50

31	Seda 5.0	2	Cajas (12 unidades)	\$12.00	\$24.00
32	Mango estándar para bisturí	1	c/u	\$10.75	\$10.75
33	Vendaje hidrocoloide	5	c/u	\$8.9	\$44.5
				TOTAL	1501.07

Bibliografía

1. Salcido R. Pressure Ulcers and Wound Care: eMedicine Physical Medicine and Rehabilitation. 2009. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/319284-overview> [Accessed October 18, 2010].
2. Gunningberg L, Stotts NA. Tracking quality over time: what do pressure ulcer data show? *International Journal for Quality in Health Care*. 2008;20(4):246 -253.
3. Animal Models of Tissue Ischemia to Evaluate the Importance of Oxygen in the Wound Healing Environment. Available at: <http://www.woundsresearch.com/article/8201> [Accessed October 18, 2010].
4. Salcido R, Popescu A, Ahn C. Animal models in pressure ulcer research. *J Spinal Cord Med*. 2007;30(2):107-116.
5. Wolff K, Johnson R. *Fitzpatrick's Color Atlas and Synopsis of Clinical Dermatology: Sixth Edition*. 6th ed. McGraw-Hill Professional; 2009.
6. FRCPath VKMM, MBBS AKA, MD NF, PhD RMM. *Robbins Basic Pathology: With STUDENT CONSULT Online Access*. 8th ed. Saunders; 2007.
7. Torre JIDL. Wound Healing, Chronic Wounds: eMedicine Plastic Surgery. 2008. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/1298452-overview> [Accessed September 18, 2010].
8. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1996;4(4):411-420.
9. Torre JIDL. Wound Healing, Chronic Wounds: eMedicine Plastic Surgery. 2008. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/1298452-overview> [Accessed October 18, 2010].
10. Animal Models of Tissue Ischemia to Evaluate the Importance of Oxygen in the Wound Healing Environment. Available at: <http://www.woundsresearch.com/article/8201> [Accessed October 18, 2010].
11. Mosby. *Diccionario Mosby de Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud: con CD*. 6th ed. Elsevier Espana; 2003.
12. European Pressure Ulcer Advisory Panel and National Pressure Ulcer Advisory Panel. Prevention and treatment of pressure ulcers: quick reference guide. *National Pressure Ulcer Advisory Panel*. 2009.
13. Salcido R. Pressure Ulcers and Wound Care: eMedicine Physical Medicine and Rehabilitation. 2009. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/319284-overview> [Accessed October 18, 2010].
14. López B, Luis J. Definición y clasificación de las úlceras por presión. *El Peu*.

2003;23(4):194.

15. Frank C. Approach to skin ulcers in older patients. *Can Fam Physician*. 2004;50:1653-1659.
16. Beebe M, Gist, Tio-Matos, et al. Wound care in the geriatric client. *CIA*. 2009:269.
17. Said HK, Hijjawi J, Roy N, Mogford J, Mustoe T. Transdermal sustained-delivery oxygen improves epithelial healing in a rabbit ear wound model. *Arch Surg*. 2005;140(10):998-1004.
18. Hyodo A, Reger SI, Negami S, et al. Evaluation of a pressure sore model using monoplegic pigs. *Plast. Reconstr. Surg*. 1995;96(2):421-428.
19. Peirce SM, Skalak TC, Rodeheaver GT. Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen*. 2000;8(1):68-76.
20. Sisco M, Mustoe TA. Animal models of ischemic wound healing. Toward an approximation of human chronic cutaneous ulcers in rabbit and rat. *Methods Mol. Med*. 2003;78:55-65.
21. Prado RP, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE, Ferreira LM. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir Bras*. 2006;21(4):258-262.
22. Niitsuma J, Yano H, Togawa T. Experimental study of decubitus ulcer formation in the rabbit ear lobe. *J Rehabil Res Dev*. 2003;40(1):67-73.
23. Ahn ST, Mustoe TA. Effects of ischemia on ulcer wound healing: a new model in the rabbit ear. *Ann Plast Surg*. 1990;24(1):17-23.
24. Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch. Dermatol. Res*. 1998;290 Suppl:S1-11.
25. Stotts NA, Rodeheaver GT, Thomas DR, et al. An instrument to measure healing in pressure ulcers: development and validation of the pressure ulcer scale for healing (PUSH). *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. 2001;56(12):M795-799.
26. Brown D. Comparing different ulcer measurement techniques: a pilot study. *Primary Intention*. 2003;11:125-135.
27. Thawer HA, Houghton PE, Woodbury MG, Keast D, Campbell K. A comparison of computer-assisted and manual wound size measurement. *Ostomy Wound Manage*. 2002;48(10):46-53.
28. Bohannon RW, Pfaller BA. Documentation of wound surface area from tracings of wound perimeters: Clinical report on three techniques. *Physical Therapy*. 1983;63(10):1622.
29. Thomas AC, Wysocki AB. The healing wound: a comparison of three clinically useful methods of measurement. *Decubitus*. 1990;3(1):18-20, 24-25.

30. Jauregui L. Introduccion a la Fotogrametría. Available at:
<http://webdelprofesor.ula.ve/ingenieria/iluis/publicaciones/Fotogrametr%EDa/CAPITULO1.pdf>.
31. Rennert R, Golinko M, Kaplan D, Flattau A, Brem H. Standardization of wound photography using the Wound Electronic Medical Record. *Adv Skin Wound Care*. 2009;22(1):32-38.
32. Flanagan M. Improving accuracy of wound measurement in clinical practice. *Ostomy Wound Manage*. 2003;49(10):28-40.
33. Khan HA. Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 49(2):89-95.
34. Gonzales Melgar. Efecto citoprotector de extractos acuosos de *Indigófera guatemalensis* e *Indigofera suffruticosa* en modelos de úlceras gástricas inducidas por etanol en ratones. 2010.
35. CCAC. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. 1984;2.