



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTO DEL AMNIO EQUINO SOBRE EL PROCESO DE
REPARACIÓN DE HERIDAS EN CABALLOS**

RODRIGO MARCELO DÍAZ LEDEZMA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas.

PROFESOR GUÍA: ENRIQUE PINTO PEÑA

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTO DEL AMNIO EQUINO SOBRE EL PROCESO DE REPARACIÓN DE HERIDAS EN CABALLOS

RODRIGO MARCELO DÍAZ LEDEZMA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ENRIQUE PINTO PEÑA
PROFESOR CONSEJERO: JULIO LARENAS HERRERA
PROFESOR CONSEJERO: GINO CATTANEO UNIVASO

SANTIAGO, CHILE
2009

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
Índice	i
Resumen	ii
Summary	iv
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	3
Objetivos	13
Material y Métodos	14
Resultados	26
Discusión	41
Conclusión	44
Bibliografía	45
Anexos	48

RESUMEN

Se evaluó el efecto de un parche biológico, amnios, sobre la cicatrización de heridas de piel completa en la parte distal de los miembros en caballos. Dos heridas de 2,5 cm² fueron creadas quirúrgicamente sobre la cara dorsal del tercer metacarpiano en cada miembro anterior de los caballos empleados en el estudio (n = 16 heridas). Cada herida fue asignada en forma aleatoria a uno de los dos grupos de tratamiento. Los vendajes evaluados fueron un parche permeable no adherente de algodón envuelto en gasa (Grupo Control); y un parche de amnios equino (Grupo Amnios).

El tiempo que tardó la epitelización completa de las heridas (herida cubierta por epitelio) fue determinado para cada herida. Al momento de cada cambio de vendaje, se determinó el área total de las heridas y se realizó un registro fotográfico de ellas para la posterior evaluación del tejido de granulación. Además, se llevó a cabo la resección del tejido de granulación cuando éste afectaba la normal cicatrización.

Los análisis estadísticos fueron hechos utilizando la prueba de Wilcoxon para comparar el tiempo de cicatrización completa. El área de la herida, y el efecto del tratamiento y del tiempo sobre el puntaje total del tejido de granulación, fueron evaluados con análisis de varianza. Se utilizó un modelo de regresión logística para analizar los datos histológicos, y Prueba de χ^2 para evaluar la frecuencia de resección del tejido de granulación exuberante. Para todas las comparaciones, un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

El tiempo medio para la cicatrización completa fue: Grupo Amnios 42,63 días; Grupo Control 55,38 días. Este fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el Grupo Control. En cuanto a la aparición del nuevo tejido epitelial no se encontraron diferencias significativas entre grupos. Las heridas del Grupo C requirieron significativamente ($p < 0,05$) mayor frecuencia de resección del tejido

de granulación (87,5 %) en comparación con el Grupo A (12,5%). La calidad del tejido de granulación fue mayor en el grupo Amnios ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en el análisis de los datos histológicos.

En este estudio, el uso de los parches de amnios sobre heridas de piel completa aceleró la reparación de las heridas e inhibió la formación de tejido de granulación exuberante. Por lo tanto, puede ser integrado dentro de los tratamientos destinados a mejorar la reparación de las heridas de los miembros en caballos.

SUMMARY

The effect of the biologic dressing, amnion, on healing of full-thickness skin on the distal limb were evaluated in horses. Two 2.5 cm² wounds were created surgically over the dorsal aspect of the cannon bone of each limb of 8 horses (n = 16 wounds). Each wound was assigned randomly to 1 of 2 treatment groups. Dressings evaluated were a nonadherent permeable gauze pad (Control Group), and a dressing of equine amnion (Amnion Group).

Wound were assessed at each dressing change, to determine total wound area, photographs of the wounds and excisions of granulation tissue. Complete healing time (wound covered by epithelium) also was determined for each wound. Statistical comparisons were made, using Wilcoxon test to compare the times of complete healing; area of wound and the effect of treatment and time on the total score of granulation tissue, were evaluated with the analyses of variance, logistic regression model was used to analyze histologic data, and χ^2 analyses was performed on the incidence of exuberant granulation tissue. For all comparisons, a value of $p < 0.05$ was considered significant.

Median time to complete healing was, Amnion Group: 42.63 days; Control Group: 55.38 days. Time to complete healing was significantly longer ($p < 0.05$) for wounds of Control Group. As for the first evidence of epithelium wasn't observed significant differences between groups. Wounds in Group C horses required significantly ($p < 0.05$) more excisions of granulation tissue (87.5%) than did those in Group A (12.5%). The quality of granulation tissue was higher in Amnion Group ($p < 0.05$). There was no significant difference in the statistical analyses of the histological data.

In this study, the use of amnion dressing on full-thickness skin wounds accelerated wound repair, and inhibited the formation of exuberant granulation tissue. Hence it may be integrated in a management strategy designed to improve the repair of limb wounds in horses.

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano de mayor tamaño en el equino, actúa a modo de barrera ante agentes patógenos y sustancias tóxicas, previene la deshidratación, regula la temperatura, y protege del daño a estructuras subyacentes.

Algunas veces la piel es incapaz de cumplir sus funciones producto de la pérdida de su integridad, fenómeno conocido como herida, el que puede ser producido tanto por agentes externos como internos.

Los caballos, durante siglos, han logrado sobrevivir gracias a su velocidad y a su respuesta natural al miedo, muchas veces actuando a ciegas ante el peligro. Desde que el hombre lo domesticó, el caballo ha estado expuesto a una gran variedad de elementos de contención como: alambres, palos, metales y otros objetos presentes en el ambiente, que potencialmente son capaces de producir traumas. Si se conjugan estos dos factores, instinto y domesticación, se evidencia que en esta especie se dan condiciones ideales para la ocurrencia de heridas (**Britton, 1970**).

En la práctica, los veterinarios de equinos son frecuentemente llamados a atender heridas, las cuales implican un intenso trabajo que muchas veces puede llegar a ser muy costoso. Para minimizar los costos de tiempo y monetarios, los veterinarios deben ser meticulosos en la selección del tratamiento.

Actualmente, en nuestro país existen diversos tratamientos enfocados en acelerar la reparación de las heridas y mejorar la calidad de la cicatriz, pero aún no existe consenso sobre el tratamiento ideal, aquél que combine efectividad a un precio razonable.

El amnios, una membrana biológica que normalmente es desechada luego del examen post parto, ha demostrado ser eficiente en acelerar la reparación de heridas en otras especies. Sin embargo, en caballos no existen antecedentes sobre la calidad de la cicatrización de las heridas sometidas a tratamientos con amnios.

Es por esto que en el presente trabajo se estudiarán los efectos de la membrana amniótica sobre la reparación de heridas en caballos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La piel es el órgano de mayor tamaño y uno de los órganos más importantes en el cuerpo del caballo. Sin la piel, el caballo moriría (**Rees**, 2004).

La piel es un órgano que está constituido por dos capas: la epidermis y la dermis. La epidermis es la capa protectora más externa de la piel, constituida por un epitelio escamoso estratificado, avascular y queratinizado que varía en grosor. La dermis proporciona la conexión entre la epidermis y el tejido subcutáneo, está compuesta de colágeno, fibras de elastina, glicosaminoglicanos y glicoproteínas; proporcionando nutrición, soporte y fuerza tensil a la epidermis. La dermis además incluye al folículo piloso, las glándulas sudoríparas y sebáceas, el músculo erector del pelo, los vasos sanguíneos y linfáticos, y los nervios cutáneos (**Riegel y Hakola**, 2003).

El espesor de la piel varía entre 1 mm y 5 mm dependiendo de la localización corporal. Siendo mayor en el dorso y en las zonas proximales de los miembros, y menor en la zona ventral del cuerpo y en la parte distal de los miembros (**Rees**, 2004).

La piel y sus derivados constituyen un complejo órgano compuesto de diferentes tipos celulares. La diversidad de esas células y su habilidad para trabajar juntas proporcionan numerosas funciones que permiten al individuo enfrentarse al ambiente externo (**Ross et al.**, 2002).

Actúa como una barrera que impide la pérdida de agua, electrolitos y macromoléculas, y proporciona soporte a varios órganos dentro del cuerpo. Almacena vitaminas, grasas, carbohidratos, electrolitos, agua, proteínas y otros materiales. Actúa como barrera protectora contra factores químicos y físicos tales como, el calor, el frío, los organismos microbiológicos, y la luz ultravioleta. Expresa

información sensorial al sistema nervioso, para calor, frío, tacto, dolor, y presión. Regula la temperatura corporal a través del manto piloso (**Rees**, 2004). Participa en la homeostasis a través de la regulación de la temperatura corporal y la pérdida de agua (**Ross et al.**, 2002). Regula la presión sanguínea, a través, de cambios en la vascularidad periférica. Produce estructuras queratinizadas tales como, el pelo, los cascos y la capa más externa de la epidermis. Es un órgano secretor y excretor, a través de las glándulas sebáceas y sudoríparas, que incluye factores antimicrobiales. Provee flexibilidad, elasticidad, y resistencia para permitir la configuración y forma. Participa en la inmunovigilancia a través de linfocitos y células de Langerhans. Es un indicador de la salud general del individuo (**Rees**, 2004).

Además, ciertas sustancias liposolubles pueden ser absorbidas a través de la piel. Aunque no es una función de la piel, ésta propiedad es frecuentemente utilizada en la administración de agentes terapéuticos (**Ross et al.**, 2002).

Los caballos frecuentemente sufren heridas en relación a su hábitat, su uso, y su instinto natural (**Gomez y Hanson**, 2005). En un estudio de heridas en caballos realizado en 19 escuelas de Medicina Veterinaria en Estados Unidos, los miembros fueron por lejos los más afectados, con un 72% de lesiones en los miembros anteriores y un 51% en los miembros posteriores (**Baxter**, 1998). Un número considerable de animales no son capaces de continuar su carrera deportiva como consecuencia de claudicaciones persistentes, aumento de volumen de las extremidades y amplias escaras, producto de la reparación de las heridas (**Wilmink y van Weeren**, 2005).

La mayoría de las heridas en los caballos pueden ser clasificadas como incisiones, laceraciones, avulsiones y punciones (**Baxter**, 1998).

Incisiones: son producto de objetos afilados, tales como bisturí, vidrios, o metal. Los bordes de la piel son pulcramente escindidos, causando un mínimo trauma y

contaminación del tejido adyacente. La mayor preocupación que se debe tener con estas heridas es la profundidad de la incisión y si involucra o no estructuras profundas como tendones o cápsulas articulares. Por lo general, en las incisiones se aplica el cierre primario de la herida (**Baxter**, 1998).

Laceraciones: heridas generalmente causadas por alambres, puertas de metal, o cualquier objeto angulado. Los bordes de la herida son irregulares y son de variable contaminación y trauma del tejido blando adyacente (**Baxter**, 1998).

Avulsiones: heridas en que el tejido ha sido arrancado, comúnmente ocurren en la parte dorsal de metacarpos o metatarsos y tarsos. Produce extenso daño del tejido adyacente y secundariamente a estructuras más profundas, tendones y hueso. La formación de sequestros es común después de este tipo de heridas cuando el hueso es expuesto. La gran mayoría de estas heridas debe ser manejada mediante cicatrización por segunda intención (**Baxter**, 1998).

Punciones: son causadas por objetos afilados que penetran los tejidos, tales como clavos, tornillos, palos y astillas. A variables profundidades con mínimo daño superficial. La mayoría de las punciones lucen como benignas pero pueden resultar en serias lesiones, por las siguientes razones: el objeto acarrea suciedad, desechos y bacterias profundamente en la herida, la herida puede penetrar estructuras sinoviales. Además, la herida externa es pequeña lo que impide un buen drenaje, y la profundidad y localización de la herida es difícil de determinar (**Baxter**, 1998).

La más común de las heridas sufridas por los caballos es la laceración. Las laceraciones ocurren con mayor frecuencia en la parte distal de los miembros. A su vez, las grandes pérdidas de tejido, la excesiva tensión de la piel, la contaminación, e infección dificultan el tratamiento de estas heridas por cierre primario y cicatrización por primera intención (**Gomez y Hanson**, 2005). Un estudio de carácter retrospectivo en caballos, determinó que solo un 24% de éstas

heridas fueron tratadas en forma exitosa por medio de su cierre primario (**Theoret**, 2006).

La cicatrización por segunda intención de las heridas en la parte distal de los miembros es más complicada en los caballos que en otras especies domésticas como resultado de varios factores. Dentro de los que se incluyen la mínima irrigación sanguínea en la porción distal de los miembros, cantidades mínimas de tejido subcutáneo, hipoxia, dificultad para inmovilizar el área y escasa musculatura cutánea (**Shwartz et al.**, 2002).

El método de cicatrización por segunda intención en la parte distal de los miembros es lento y está sujeto a complicaciones, particularmente a la formación de excesivo tejido de granulación, lo que dificulta la contracción y epitelización de las heridas (**Bertone**, 1989). Además, que el epitelio formado durante la cicatrización por segunda intención es frágil y fácilmente traumatizable (**Goodrich et al.**, 2000). Esas dificultades comprometen particularmente a las heridas de los miembros, mientras que las heridas ubicadas en el cuerpo sanan relativamente bien y en un período de tiempo menor (**Wilmink y van Weeren**, 2005).

La reparación de heridas por segunda intención puede ser dividida en cuatro eventos:

Inflamación: durante esta fase las células polimorfonucleares (PMN) y macrófagos migran hacia el sitio de la herida para limpiarla de bacterias y de tejido no viable. Además, los macrófagos liberan varias sustancias biológicamente activas que son esenciales para el reclutamiento de más células inflamatorias y de células mesenquimáticas, iniciando así el proceso de reparación (**Wilmink y van Weeren**, 2005).

Formación del tejido de granulación: fibroblastos, células endoteliales y macrófagos se mueven dentro del espacio de la herida como una unidad y son dependientes unos de otros. Los macrófagos proporcionan citoquinas y factores de crecimiento necesarios para la estimulación de la fibroplasia y angiogénesis. Los fibroblastos constituyen la nueva matriz extracelular (MEC) necesaria para dar soporte a las células en crecimiento. Los vasos sanguíneos transportan el oxígeno y los nutrientes necesarios para el metabolismo celular. Los fibroblastos usan la malla de fibrina como una matriz provisoria y rápidamente es reemplazada por una nueva MEC constituida por glicoproteínas, proteoglicanos y colágeno. El tejido de granulación llena el espacio y es la base para la contracción de la herida y la migración epitelial (**Wilmink y van Weeren, 2005**).

Contracción de la herida: es causada por la acción de fibroblastos diferenciados (miofibroblastos) en el tejido de granulación, los que contienen filamentos de músculo liso. La contracción de esos fibroblastos hace que los márgenes de la herida se muevan en forma centrípeta, reduciendo el área de la herida. La contracción de la herida determina la velocidad de la reparación por segunda intención y el aspecto cosmético final de la cicatriz (**Wilmink y van Weeren, 2005**).

Epitelización: ocurre durante la fase final del cierre de la herida y es un proceso lento. Aunque la epitelización comienza pocas horas después del trauma con la migración de las células epiteliales, macroscópicamente, ésta se puede observar varios días después de producida la herida. El nuevo epitelio carece de estructuras anexas a la piel, y es delgado y frágil porque tiene sólo unas pocas proyecciones epidérmicas, y esta parte de la herida sigue siendo visible como una cicatriz superficial (**Wilmink y van Weeren, 2005**).

La formación de tejido de granulación exuberante es una complicación frecuente en la reparación por segunda intención de las heridas en la parte distal de los miembros en los caballos. El tejido de granulación exuberante suele tener

aparición poco saludable, su superficie está plegada formando muchos surcos y hendiduras, y habitualmente sobresale por encima de los bordes de la herida. Las hendiduras contienen depósitos de fibrina que no fueron retirados por la respuesta inflamatoria aguda (**Wilmink y van Weeren, 2005**).

El tejido de granulación exuberante puede disminuir la tasa de contracción y epitelización de la herida pues actúa como una barrera física que impide el movimiento de los márgenes de las heridas y del epitelio que está avanzando (**Hanson, 2006**).

Existen diferentes tratamientos que han sido recomendados para reducir el tejido de granulación y mejorar la cicatrización por segunda intención de las heridas de la parte distal de los miembros en equinos. Sin embargo, las heridas que cicatrizan por segunda intención son usualmente manejadas con vendajes (**Gomez y Hanson, 2005**).

Los vendajes pueden ayudar en la cicatrización por segunda intención de varias maneras:

- Reducen la contaminación y proporcionan protección ante futuros traumas (**Baxter, 1998**).
- Absorben el exudado inflamatorio, creando un ambiente más propicio para la cicatrización de las heridas (**Baxter, 1998**).
- Reducen la pérdida de dióxido de carbono desde la herida, de esta forma provocan una disminución en el pH de la herida. Este efecto hace que la curva de disociación de la oxihemoglobina se desplace hacia la izquierda, liberando así más oxígeno a los tejidos (**Baxter, 1998**).
- Producen un aumento de la humedad y de la temperatura (**Baxter, 1998**).

- Producen un efecto de aplanamiento en la superficie de la herida, promoviendo la epitelización y contracción de la herida (**Baxter**, 1998).

La cicatrización de las heridas en los miembros de los caballos, tanto por primera como por segunda intención, es a menudo retrasada producto de la distensión de la herida, como resultado de una inflamación crónica, y/o del excesivo movimiento en el sitio de la herida. Existen diferentes tipos de vendajes que son usados para controlar esa distensión, proporcionar adhesión, e inmovilizar el área para así minimizar el daño del tejido que se está formando (**Gomez y Hanson**, 2005).

Los vendajes están normalmente compuestos por tres capas:

Capa primaria o capa de contacto: que a menudo es llamada parche. Explicada más adelante con mayor detalle.

Capa secundaria o intermedia: cuyo propósito es absorber agentes deletéreos (por ejemplo: suero, sangre, exudado, bacterias, detritus celulares) desde la herida. Esta capa intermedia debe ser capaz de absorber la humedad, proteger la herida de traumas y evitar el movimiento excesivo de la zona. Los materiales utilizados como capa secundaria deben ser cuidadosamente aplicados para ajustarse a la forma de la zona afectada (**Gomez y Hanson**, 2005).

Capa terciaria o externa: usualmente está compuesta por materiales más rígidos que las capas anteriores. El propósito de la capa externa es mantener a la segunda capa en su lugar, prevenir la contaminación y trauma, proveer adherencia para así minimizar la expansión del sitio afectado con el consecuente incremento de la tensión de los bordes de la herida, y disminuir el rango de movimiento (**Gomez y Hanson**, 2005).

El parche ideal es capaz de proporcionar y mantener un ambiente óptimo, y un adecuado intercambio gaseoso en la superficie de la herida lo que favorece la fase proliferativa de la reparación, particularmente la epitelización. Los parches deben también proteger la herida de infecciones y proveer aislamiento térmico. Un parche ideal ocluye el espacio muerto, permite una remoción atraumática del excesivo exudado desde la superficie de la herida, y es fácil de manipular y no antigénico (**Gomez y Hanson, 2005**).

Los parches pueden ser clasificados como sintéticos, semi-sintéticos o biológicos.

Parches Sintéticos: son compuestos fabricados por el hombre o materiales plásticos en forma de gasa, películas, aerosoles o gel (**Gomez y Hanson, 2005**).

Parches Semi-sintéticos: son una combinación de productos sintéticos y biológicos (**Gomez y Hanson, 2005**).

Parches Biológicos: son obtenidos desde fuentes naturales e incluyen al amnios, piel de cadáveres humanos y piel de otras especies, así como a bio-materiales compuestos de varias proteínas o cultivos de células presentes en la cicatrización de heridas. Los parches biológicos a menudo ejercen efectos benéficos sobre la herida además de ser una capa protectora (**Gomez y Hanson, 2005**).

Según la capacidad para adherirse a la herida los parches son clasificados en adherentes y no adherentes. De acuerdo a la capacidad de permitir el paso de exudado y vapores, los parches son clasificados en oclusivos, semi-oclusivos, o permeables (**Gomez y Hanson, 2005**).

En los últimos años, el interés se ha enfocado en las ventajas de los parches oclusivos para el tratamiento de heridas. Los parches oclusivos actúan como barrera física para inhibir la contaminación por bacterias patógenas,

estimulan la síntesis de colágeno, y reducen la pérdida de fluidos desde los tejidos dañados. Desde su introducción en 1962, los parches oclusivos han probado disminuir, cerca de un 50%, el tiempo de cicatrización de heridas de piel completa en humanos (**Ramsey et al.**, 1995).

Los parches oclusivos biológicos, tales como la piel de cerdo y la de cadáveres humanos, son frecuentemente usados en seres humanos pero son poco usados en medicina veterinaria principalmente porque su costo es muy alto y su disponibilidad es escasa. El amnios de origen humano es otro parche biológico que ha sido usado en el tratamiento de grandes heridas de piel y quemaduras en seres humanos desde principios del siglo XX (**Ramsey et al.**, 1995).

El amnios es esencialmente una capa de células epiteliales superpuestas en una matriz que contiene gran cantidad de colágeno y fibroblastos dispersos (**Gomez y Hanson**, 2005).

La membrana amniótica tiene muchas características de un vendaje ideal (**Bigbie et al.**, 1991). El amnios se adhiere y se ajusta a la superficie de la herida, y posee baja inmunogenicidad como resultado de su origen fetal (**Baxter**, 1998). Su naturaleza oclusiva previene la pérdida de proteínas, fluidos y electrolitos desde los tejidos dañados, y ayuda a controlar la contaminación bacteriana (**Gomez y Hanson**, 2005). Disminuye el dolor en el sitio de la herida, y promueve un retorno temprano a la movilidad del sitio afectado.

Una de las últimas propiedades descubiertas del amnios es su habilidad para disminuir el número de bacterias en la herida y estimular la re-epitelización. En contraste con los otros parches biológicos, los parches de amnios equino están disponibles y son fáciles de obtener para ser usados en medicina veterinaria (**Ramsey et al.**, 1995).

Estudios realizados en ponis sostienen que el amnios puede ser usado en heridas de la parte distal de los miembros acelerando el tiempo de cicatrización de éstas (**Goodrich et al.**, 2000). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios que indiquen la calidad de esa cicatriz. Además, las heridas sobre la parte distal de los miembros y sobre el cuerpo de los ponis, sanan mucho más rápido y de manera más favorable que las mismas heridas en caballos (**Wilmink et al.**, 1999).

El bajo costo, la facilidad de obtención y la capacidad de ser almacenados hacen del parche de amnios equino una muy buena alternativa a probar en caballos, es por esto que el presente estudio busca proporcionar antecedentes para el empleo de este parche biológico en nuestro país.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los parches de amnios equino sobre el tiempo y calidad de la reparación de heridas inducidas experimentalmente en caballos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer el tiempo de cicatrización de la herida al utilizar parches de amnios equino.
- Conocer las características del tejido de granulación al usar parches de amnios equino.
- Realizar un estudio histológico para establecer la calidad de la cicatrización al utilizar parches de amnios equino.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES

- Animales Experimentales:
 - Ocho caballos.

- Anestésico y Tranquilizante:
 - Lidocaína 2%.
 - Xilacina 10%.

- Material Quirúrgico:
 - Lavador quirúrgico.
 - Pinzas quirúrgicas.
 - Bisturí N° 3.
 - Molde de 2,5 X 2,5 cm.
 - Guantes N° 7 ½.
 - Apósitos estériles.

- Antiinflamatorio No Esteroidal:
 - Fenilbutazona.

- Otros:
 - Jeringas desechables.
 - Algodón.
 - Alcohol 70°.
 - Clorhexidina 0,05%.
 - Ácido acético 0,25%.
 - Suero fisiológico NaCl 0,9%.
 - Vendas elásticas desechables.
 - Vendas de gasa 1,5 m X 10 cm.

En este estudio se emplearon 8 caballos clínicamente sanos, estado que se determinó mediante anamnesis, examen clínico y exámenes complementarios de laboratorio: Hemograma y Perfil bioquímico.

Previo al estudio los ejemplares fueron desparasitados y permanecieron en pastura por cuatro semanas.

Durante el estudio los ejemplares estuvieron alojados en pesebreras de 3 X 3 m y fueron alimentados con heno de alfalfa a libre disposición y agua también *ad libitum*.

Los caballos fueron examinados diariamente por signos de incomodidad, cojeras, enfermedades sistémicas, mantención apropiada del vendaje, además de un completo examen clínico hasta que la totalidad de las heridas estuvieron completamente cicatrizadas.

A cada animal se le asignó un número y se completó una ficha clínica individual, incluyendo los datos que se obtuvieron del examen clínico y exámenes de laboratorio complementarios (ver anexo N° 1).

El protocolo experimental utilizado en este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (ver anexo N° 2).

Obtención y almacenamiento del amnios.

Las placentas fueron recolectadas dentro de dos horas post parto desde potrillos nacidos de yeguas sin antecedentes de enfermedad pre ni peri parto. El amnios fue separado desde la porción coriónica de la placenta, cercano a la convergencia de los vasos umbilicales. La contaminación visible fue removida por medio de irrigación a presión con suero fisiológico (NaCl 0,9%) estéril junto con desbridamiento manual, empleando guantes estériles.

Luego el amnios fue expuesto sobre un paño de campo estéril y posteriormente cortado en segmentos de 5 X 5 cm. Los segmentos fueron colocados en una solución de clorhexidina al 0,05%. El amnios en la solución fue refrigerado a 4° C. Luego de 24 horas los segmentos fueron lavados en forma secuencial en 6 soluciones estériles, según lo descrito por Ramsey *et al.* (1995). La primera base contenía clorhexidina 0,05%, la segunda suero fisiológico (NaCl 0,9%) estéril, la tercera con solución de ácido acético 0,25%, la cuarta solución suero fisiológico (NaCl 0,9%) estéril, la quinta solución clorhexidina 0,05% y la última solución suero fisiológico (NaCl 0,9%) estéril. Después del último lavado, los segmentos de amnios fueron posicionados en recipientes estériles que contenían 8 segmentos cada uno, en solución de clorhexidina al 0,05%. Dentro de los cuales fueron almacenados en refrigeración a 4° C hasta el momento de su empleo en el estudio.

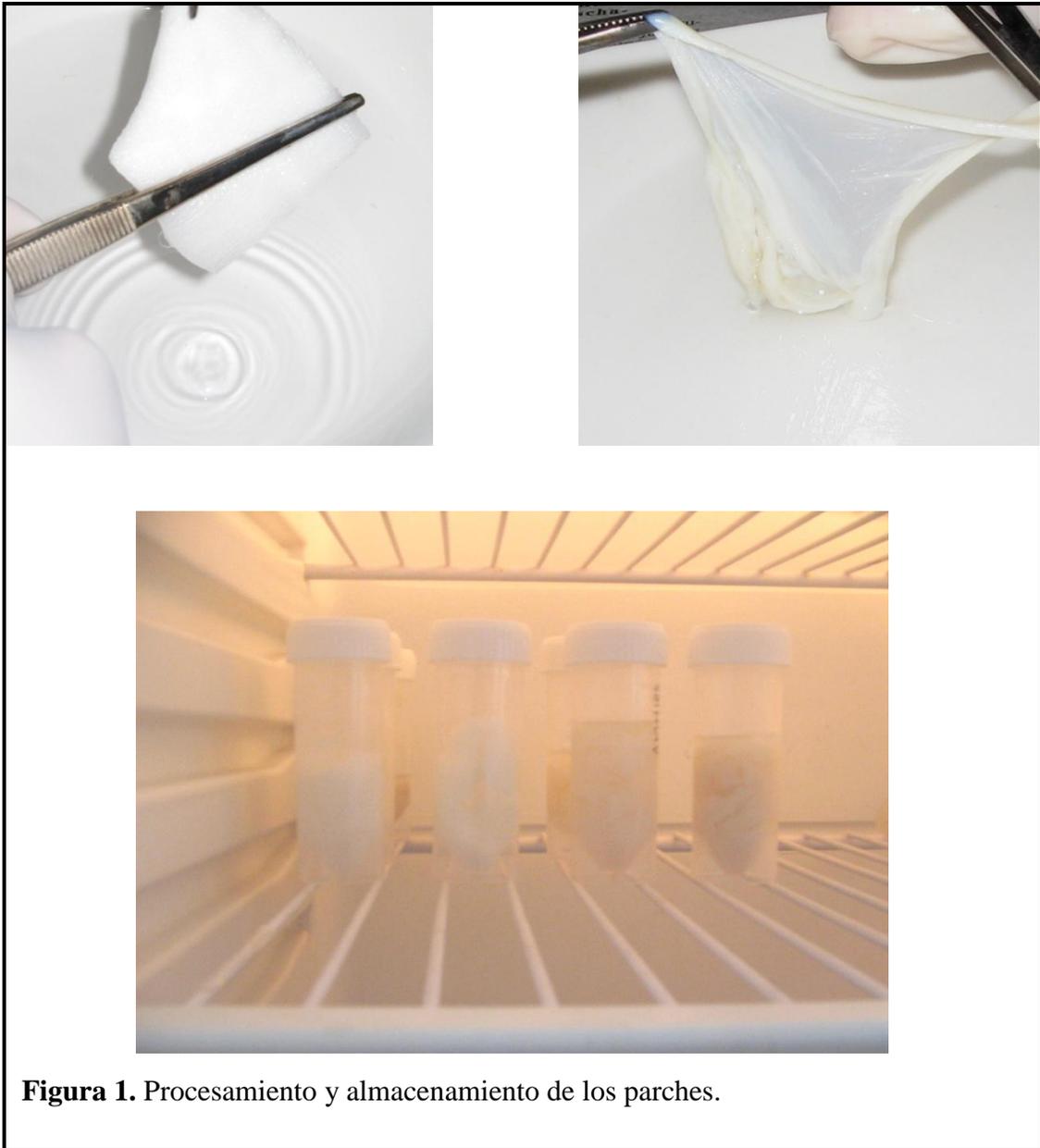


Figura 1. Procesamiento y almacenamiento de los parches.

Previo a comenzar la aplicación de los parches, se enviaron muestras de parche de amnios para su estudio microbiológico (ver Anexo 3). El análisis fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, el cual determinó que al cultivo para bacterias aerobias y facultativas, las muestras resultaron negativas a desarrollo bacteriano.

Diseño Experimental.

Se determinó el número de muestras utilizadas considerando el antecedente que la variable “tiempo de cicatrización” para heridas de las mismas características que las realizadas en este estudio tiene (**Goodrich et al.**, 2000):

- Desviación estándar = 2,76.
- Diferencia entre grupos = 5 días.
- $\alpha = 0,05$.
- Potencia = 95%.

Por lo tanto, se utilizaron un total de ocho muestras Grupo Amnios y ocho muestras Grupo Control. Para este efecto se utilizaron 8 ejemplares.

Se formaron dos grupos de tratamientos:

- Grupo Parche Amnios: recibió un parche de amnios ($n = 8$).
- Grupo Parche Control: recibió un parche convencional, compuesto por un trozo de algodón envuelto en gasa ($n = 8$).

Los parches convencionales fueron procesados y almacenados de igual manera que los parches de amnios (ver figura 1).

Las capas secundarias y terciarias del vendaje fueron iguales para ambos grupos, la capa intermedia fue una venda de gasa y la tercera capa una venda elástica desechable.

Cada caballo fue su propio control, y la asignación del tratamiento fue realizada al azar, teniendo en consideración las recomendaciones realizadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Tabla 1. Asignación de los grupos tratamientos.

Caballo	Grupo Parche Amnios	Grupo Parche Control
1	Metacarpo Izquierdo	Metacarpo Derecho
2	Metacarpo Izquierdo	Metacarpo Derecho
3	Metacarpo Derecho	Metacarpo Izquierdo
4	Metacarpo Derecho	Metacarpo Izquierdo
5	Metacarpo Derecho	Metacarpo Izquierdo
6	Metacarpo Izquierdo	Metacarpo Derecho
7	Metacarpo Derecho	Metacarpo Izquierdo
8	Metacarpo Izquierdo	Metacarpo Derecho

Procedimiento quirúrgico para la inducción de heridas y un tratamiento.

Los caballos se encontraban en ayuno de 12 horas previo a la cirugía. La sedación fue inducida con xilacina a dosis de 0,5 mg/kg., E. V. (ver Figura 2). Se aplicó anestesia local en cada zona quirúrgica para lo cual se utilizó lidocaína 2% (ver Figura 3). Esto proporcionó insensibilidad en la zona durante un tiempo mayor al requerido para la cirugía.

En cada caballo se seleccionó, previo al inicio del estudio, en forma aleatoria la aplicación de cada tratamiento. Se utilizaron ambos miembros anteriores, los cuales fueron depilados y preparados en forma aséptica para la cirugía. Luego en cada miembro seleccionado se removió una sección completa de piel de 2,5 X 2,5 cm desde la cara dorsal del metacarpo en su punto medio.

Se utilizó un bisturí N ° 3 y un molde (ver figura 4 letra D), ambos estériles, para alcanzar la uniformidad de las heridas. Se aplicó un vendaje delgado sobre cada una de las heridas de modo de controlar la hemorragia, por las primeras 24 horas. El vendaje consistía en un apósito estéril asegurado por una venda de gasa

estéril de 10 cm en cuyo extremo se puso cinta adhesiva para la sujeción. Los caballos fueron tratados con fenilbutazona (2,2 mg/kg. EV) cada 12 horas por dos días luego de la cirugía.



Figura 2. (A) y (B) Sedación del paciente.



Figura 3. (A) Depilación de la zona quirúrgica; (B) Aplicación de anestesia local; (C) Preparación aséptica de la zona quirúrgica.



Evaluación de la cicatrización de las heridas.

Los vendajes fueron cambiados las dos primeras semanas cada dos días y posteriormente cada tres días hasta que ocurrió una completa cicatrización de las heridas. La cicatrización fue considerada completa cuando la superficie de la herida estuvo completamente cubierta con epitelio (**Goodrich et al., 2000**). Al momento de cada cambio de vendaje las heridas fueron limpiadas con una gasa estéril y suero fisiológico (NaCl 0,9%) estéril.

Evaluación Macroscópica.

La información recopilada para cada herida fue: El día en que por primera vez se observó el nuevo epitelio. El tiempo que tardó la cicatrización completa. Además, se tomó una fotografía con cámara digital utilizando una escala numérica

bidimensional graduada en milímetros, a cada momento en que se cambió el vendaje para evaluar progresión de la retracción cicatricial.

Se registró también, el número de veces que el tejido de granulación fue escindido. Para este efecto, la cantidad de tejido de granulación fue graduada según la escala de Goodrich *et al.*(2000):

- Grado 1: tejido de granulación bajo el nivel de los bordes de la piel.
- Grado 2: tejido de granulación al nivel de los bordes de la piel.
- Grado 3: tejido de granulación sobre el nivel de los bordes de la piel.
- Grado 4: tejido de granulación sobre el nivel de los bordes de la piel y proyectándose sobre el borde del epitelio que va avanzando.

Para este estudio los grados 3 y 4 fueron considerados como tejido de granulación exuberante y fueron escindidos con una hoja de bisturí N ° 3.

Para realizar la evaluación del tejido de granulación, se utilizó una escala predeterminada, descrita por Ducharme-Desjarlais *et al.*, para medir las siguientes variables:

- Protuberancia del tejido de granulación:
0 = No 1 = Medio 2 = Marcada.
- Calidad del tejido de granulación:
0 = Plano 1 = Rugoso.
- Color del tejido de granulación:
0 = Rosado 1 = Amarillo o rojo oscuro.

El puntaje total (valor máximo de 4) fue calculado en base a la importancia asignada a cada criterio, siendo éste el siguiente:

Protuberancia = 50%

Calidad = 25%

Color = 25%.

Las muestras con puntaje cero o cercano a cero, fueron consideradas de mejor calidad.

Procedimiento para la obtención de las biopsias.

Una vez finalizado el proceso de cicatrización se tomaron biopsias desde el centro de cada lesión para evaluar la calidad de la cicatriz. Al momento de obtener la biopsia los caballos fueron sedados con xilacina (0,05 mg/kg. E. V.) y los sitios de obtención de las muestras fueron preparados en forma aséptica e infiltrados con lidocaína 2% para proporcionar insensibilidad durante el procedimiento.

Evaluación Histológica.

El análisis y procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Para cada muestra se realizó una tinción de Hematoxilina-Eosina y una tinción Mallory que es una técnica específica para el estudio de tejido conectivo.

La evaluación histológica fue realizada a través de un estudio ciego, por lo tanto el observador desconocía el grupo al cual pertenece cada muestra de biopsia y evaluó las muestras según un método previamente estandarizado (**Ducharme-Desjarlais et al.**, 2005). Se evaluó:

- Grado de inflamación:

0 = nada, 1 = mínima, 2 = moderada, y 3 = marcada.

- Angiogénesis.
0 = nada, 1 = mínima, 2 = moderada, y 3 = marcada.
- Fibrosis.
0 = nada, 1 = mínima, 2 = moderada, y 3 = marcada.
- Hiperplasia epitelial.
0 = nada, 1 = mínima, 2 = moderada, y 3 = marcada.

Las muestras con puntaje cero o cercano a cero, fueron consideradas de mejor calidad.

Análisis estadístico.

- La variable tiempo de cicatrización se comparó mediante la prueba de Wilcoxon para muestras asociadas.
- Para comparar el área de las heridas se utilizó un modelo lineal de mediciones repetidas, con tratamiento y tiempo como factores dentro de individuo, mediante Análisis de Varianza.
- Para evaluar la asociación entre frecuencia de resección y el grupo de tratamiento se utilizó la prueba de hipótesis de independencia de χ^2 .
- Para analizar el efecto del tratamiento y del tiempo sobre el puntaje total del tejido de granulación, se utilizó un modelo lineal de mediciones sucesivas, con el tiempo y tratamiento como factores dentro de grupo, mediante Análisis de Varianza

- Para determinar la calidad de la cicatriz se utilizó un modelo de regresión logística para analizar los datos histológicos.

En todas las comparaciones se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los valores obtenidos en los diferentes análisis se procesaron estadísticamente mediante el programa InfoStat (versión 2004).

RESULTADOS

Análisis Microbiológico.

La evaluación microbiológica de los parches empleados en el estudio reveló que se encontraban negativos al desarrollo bacteriano, al momento de comenzar el estudio (ver anexo N ° 3).

Todos los vendajes permanecieron intactos durante la recuperación de la anestesia y entre cada cambio de vendaje. En un 62,5% de las heridas pertenecientes al grupo parche control (Grupo C), el parche se adhirió a la herida durante los primeros 15 días del estudio. La remoción de estos vendajes estuvo asociada con incomodidad y hemorragia. En cambio, los vendajes del grupo parche de amnios (Grupo A), no presentaron dificultades en su remoción.

Cantidades moderadas a abundantes de exudado fueron encontradas en 6 de las heridas pertenecientes al Grupo C, y en 1 del Grupo A. Solamente se realizó una apreciación subjetiva del exudado encontrado en los vendajes al momento de cada cambio. Sin embargo, existían notables diferencias entre grupos. Las heridas pertenecientes al Grupo A tuvieron mínimas cantidades de exudado claro y de aspecto gelatinoso bajo el parche de amnios. No obstante, cantidades moderadas y abundantes de exudado amarillo y denso fue observado en los vendajes del Grupo C.

El examen clínico general de los individuos empleados en el estudio estuvo siempre en la normalidad.

Aparición del nuevo epitelio.

Los días en que se observó por primera vez el nuevo epitelio fueron entre los días 4 y 9. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 2. Día que por primera vez se observa el nuevo epitelio.

Grupo	Variable	n	Media \pm D. E.	Mínimo	Máximo
A	Día aparición nuevo epitelio	8	6,63 \pm 2,33	4	9
C	Día aparición nuevo epitelio	8	6,13 \pm 1,89	4	9

Grupo C = control; Grupo A = amnios.

D. E.: Desviación estándar.

Tiempo de Cicatrización

Los días necesarios para la completa cicatrización fueron significativamente diferentes entre los grupos. Las heridas vendadas con amnios cicatrizaron significativamente más rápido ($p < 0,05$; media de 42,63 días) que las heridas del Grupo C (media de 55,38 días; Tabla 3).

Los días en que ocurrió la completa cicatrización en ambos grupos estuvieron entre 35 y 63 días (media de 47 días). Nueve heridas cicatrizaron en menos de 47 días. De esas, ocho pertenecían al Grupo A y una al Grupo C. Cinco heridas requirieron más de 56 días para obtener la cicatrización completa, todas ellas pertenecían al Grupo C. Todas las heridas del grupo A no requirieron más de 46 días para alcanzar su completa cicatrización.

Tabla 3. Comparación de los días que tardó la cicatrización completa de las heridas en la parte distal de los miembros.

Grupo	N ° de Heridas	Mínimo	Máximo	Media ± D. E.
A	8	35	46	42,63 ± 3,89
C	8	43	63	55,38 ± 6,00

Existe diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($p < 0,0005$).

Grupo C = control; Grupo A = amnios.

D. E.: Desviación estándar.

Retracción Cicatricial

La retracción cicatricial fue relacionada inversamente con el área total de la herida. Durante los primeros 4 días la media del área de las heridas de los Grupos A y C aumentaron desde 625 mm² y 625 mm² a 766,69 mm² y 799 mm², respectivamente. Sin existir diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0,05$). Desde el día 4 hasta el día 63, el área total de las heridas de los dos grupos estuvo en disminución.

La media del área total de las heridas durante los días 7 y 18 fue menor en el Grupo A, con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Durante los días 21 y 25 no existieron diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, desde el día 25 hasta el último día de evaluación, existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a la media del área total de las heridas, siendo menores las áreas de las heridas pertenecientes al Grupo A.

Figura 5. Relación entre los días y la media del área de la herida medida en mm².

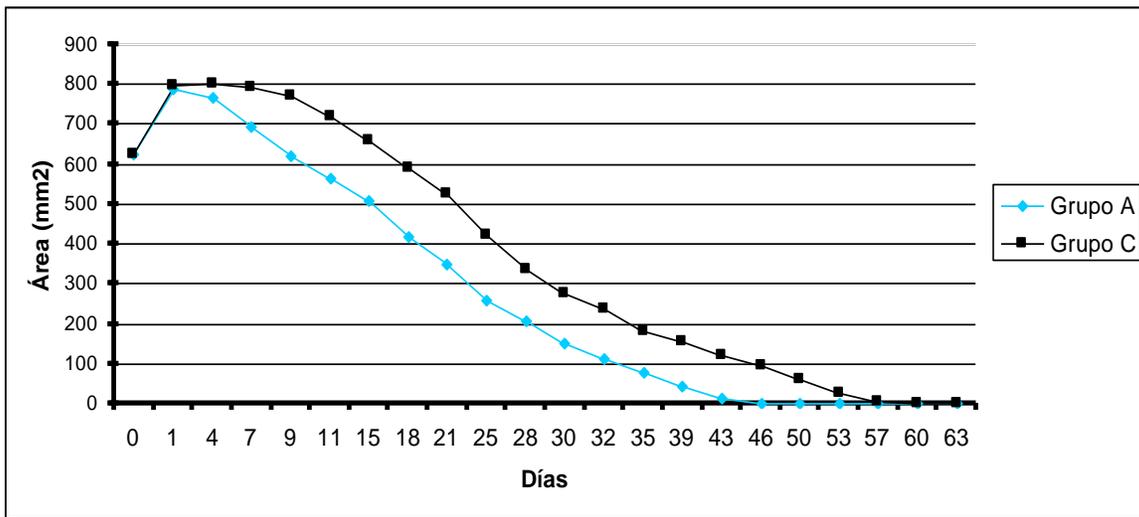


Figura 6. Porcentaje de heridas cicatrizadas durante el estudio separadas por grupo tratamiento.

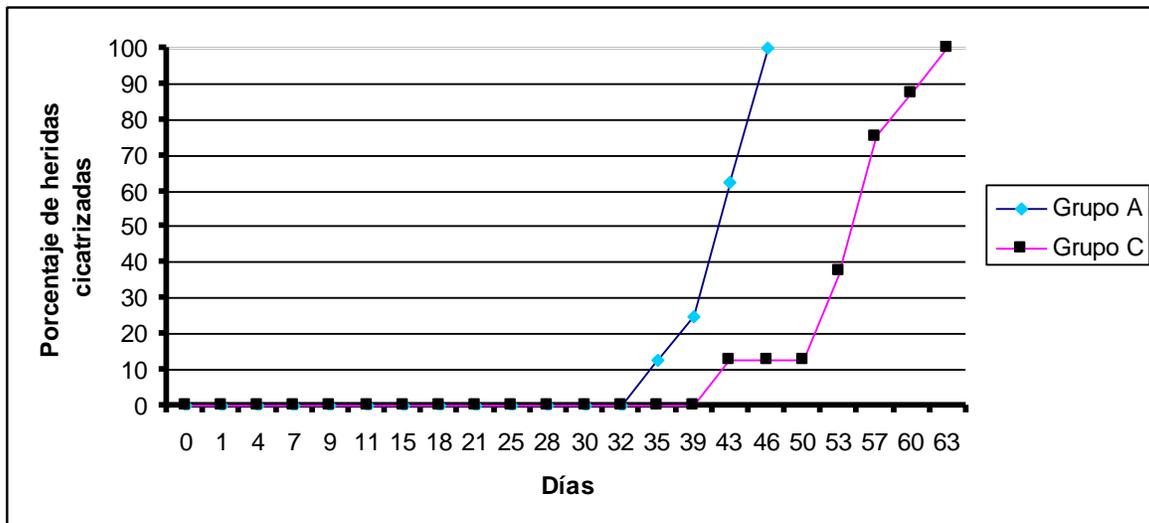


Tabla 4. Área total de las heridas (mm²). El símbolo (*) indica diferencias significativas entre grupos.

Días	Grupo	N	Media ± D. E.	Mínima	Máxima
0	A	8	625 ± 0	625	625
0	C	8	625 ± 0	625	625
1	A	8	787,25 ± 32,99	750	837
1	C	8	796,75 ± 32,15	756	837
4	A	8	766,69 ± 53,96	687,5	840
4	C	8	799,00 ± 49,92	750	900
7	A	8	693,25 ± 71,01*	600	825
7	C	8	790,75 ± 38,61*	742	825
9	A	8	618,94 ± 66,67*	538	756
9	C	8	770,50 ± 77,44*	657,5	900
11	A	8	563,25 ± 60,82*	500	687,5
11	C	8	717,69 ± 97,14*	587,5	900
15	A	8	508,38 ± 60,11*	400	600
15	C	8	659,56 ± 99,21*	552	840
18	A	8	418,88 ± 76,96*	300	563
18	C	8	595,88 ± 102,5*	480	784
21	A	8	348,75 ± 74,58	225	480
21	C	8	523,38 ± 101,06	400	720
25	A	8	257,00 ± 89,38	120	400
25	C	8	423,06 ± 117,03	262,5	625
28	A	8	205,38 ± 60,98*	100	300
28	C	8	335,38 ± 97,73*	150	488
30	A	8	152,56 ± 48,65*	66,5	196
30	C	8	273,88 ± 75,85*	104	360
32	A	8	113,69 ± 51,38*	32,5	165
32	C	8	235,31 ± 74,29*	66,5	300
35	A	7	77,81 ± 49,48*	0	125
35	C	8	181,94 ± 61,36*	38,5	240
39	A	6	41,56 ± 37,65*	0	100
39	C	8	152,94 ± 60,27*	10,5	203
43	A	3	12,25 ± 20,01*	0	48
43	C	7	121,25 ± 55,9*	0	188
46	A	0	0*	0	0
46	C	7	94,06 ± 46,21*	0	160

Frecuencia de resección

En el estudio se evidenció asociación entre la frecuencia de resección y el grupo tratamiento ($p < 0,05$) a favor del Grupo C. De las 16 heridas del estudio, 8 (50%) presentaron tejido de granulación exuberante (grados 3 - 4, según Goodrich et al.). Por lo que el tejido de granulación les fue escindido al menos una vez durante el estudio (Tabla 5).

De las ocho heridas que presentaron tejido de granulación exuberante, siete pertenecían al Grupo C (87,5%). De estas siete, 3 fueron escindidas una vez, 3 dos veces, y 1 tres veces. La única herida del Grupo A que presentó tejido de granulación exuberante debió ser escindida en dos oportunidades.

Las múltiples escisiones resultaron con medias de escisiones por herida de 0.25 y 1.5 para los Grupos A y C, respectivamente.

La resección del tejido de granulación exuberante comenzó a ser necesaria el día 9 para el Grupo C y el día 25 para el Grupo A. La última resección ocurrió el día 43 para el Grupo C y el día 28 para el Grupo A.

Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos para el desarrollo de tejido de granulación exuberante (Figura 7).

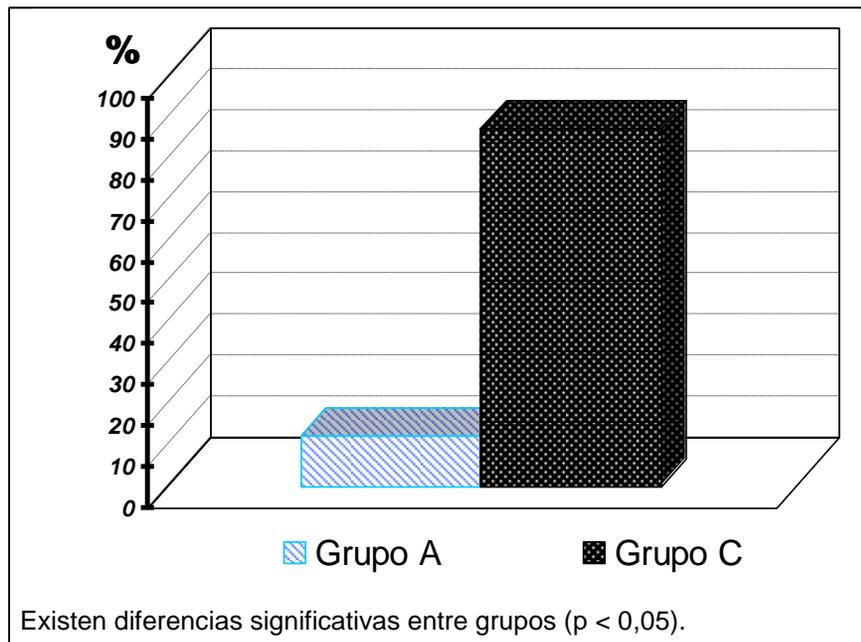
Tabla 5. Análisis estadístico de la frecuencia de resección del tejido de granulación exuberante.

Grupo	N ° de heridas	N ° de heridas con T. G. grado 3-4	% de heridas con T. G. grado 3-4
A	8	1	12,5 ^a
C	8	7	87,5 ^b

Tejido de granulación grados 3 y 4, fueron aquellas heridas en que se escindió el tejido de granulación exuberante.

Grupos con letras diferentes tienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 7. Porcentaje de heridas por grupo, que desarrollaron tejido de granulación exuberante.



Evaluación del tejido de granulación

Los análisis estadísticos revelaron efectos significativos del tratamiento ($p < 0,0001$), del tiempo ($p < 0,0001$) y de la interacción tiempo – tratamiento ($p < 0,0001$) sobre el puntaje total del tejido de granulación.

El análisis estadístico demuestra que el puntaje total del tejido de granulación fue menor en el Grupo A que en el Grupo C ($p < 0,05$). Indicando una calidad superior del tejido de granulación de las heridas tratadas con parches de amnios.

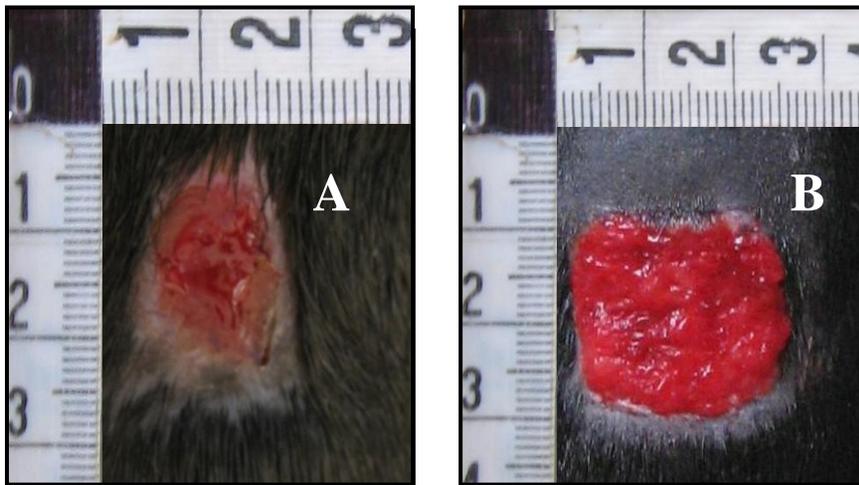
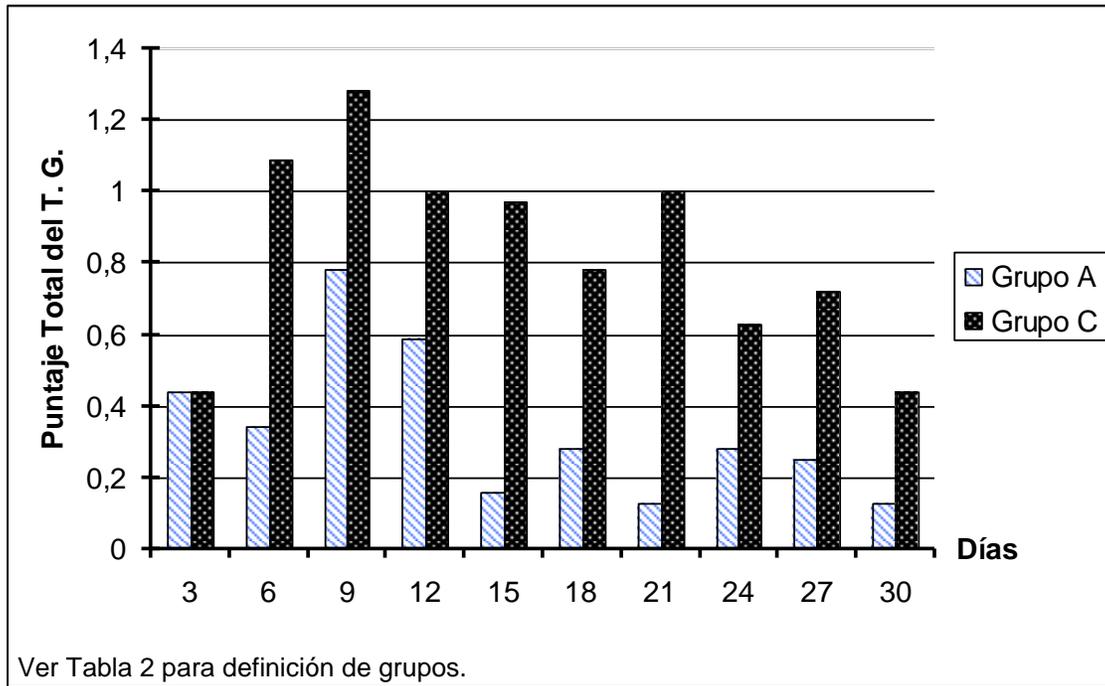


Figura 8. Fotografías de la parte distal de ambos miembros anteriores de un caballo 12 días después de la cirugía. **A:** tejido de granulación plano, saludable y con crecimiento de epitelio en los bordes; en una herida vendada con amnios. **B:** tejido de granulación exuberante (grado III) en una herida vendada con parche control.

Figura 9. Puntaje total del tejido de granulación por grupos.



Día	Grupo	n	Medias ± D. E.	Mínimo	Máximo
-----	-------	---	----------------	--------	--------

3	A	8	0,44 ± 0,40	0,00	1,00
3	C	8	0,44 ± 0,44	0,00	1,00
6	A	8	0,34 ± 0,34	0,00	1,00
6	C	8	1,09 ± 1,09	0,25	1,50
9	A	8	0,78 ± 0,49	0,00	1,50
9	C	8	1,28 ± 0,16	1,00	1,50
12	A	8	0,59 ± 0,27	0,00	0,75
12	C	8	1,00 ± 0,30	0,50	1,25
15	A	8	0,16 ± 0,27	0,00	0,75
15	C	8	0,97 ± 0,31	0,75	1,50
18	A	8	0,28 ± 0,39	0,00	0,75
18	C	8	0,78 ± 0,21	0,50	1,25
21	A	8	0,13 ± 0,23	0,00	0,50
21	C	8	1,00 ± 0,35	0,75	1,50
24	A	8	0,28 ± 0,28	0,00	0,75
24	C	8	0,63 ± 0,27	0,00	0,75
27	A	8	0,25 ± 0,27	0,00	0,75
27	C	8	0,72 ± 0,16	0,50	1,00
30	A	8	0,13 ± 0,23	0,00	0,50
30	C	8	0,44 ± 0,32	0,00	0,75

Tabla 6. Evaluación de la calidad del tejido de granulación, a través del análisis estadístico del puntaje total del tejido de granulación.

Análisis histológico.

El análisis estadístico reveló que no existe efecto del tratamiento sobre las variables histológicas que fueron evaluadas.

Tabla 7. Evaluación histológica de la cicatriz.

Variable	Grupo	Media ± D. E.	Mínimo	Máximo
Grado de Inflamación	A	0,75 ± 0,89 ^a	0,00	2,00
	C	0,75 ± 0,46 ^a	0,00	1,00
Angiogénesis	A	2,13 ± 0,64 ^b	1,00	3,00
	C	2,25 ± 0,89 ^b	1,00	3,00
Fibrosis	A	2,38 ± 0,52 ^c	2,00	3,00
	C	2,25 ± 0,71 ^c	1,00	3,00
Hiperplasia Epitelial	A	1,13 ± 0,99 ^d	0,00	3,00
	C	1,75 ± 1,28 ^d	0,00	3,00
Todas	A	6,38 ± 1,19 ^e	4,00	8,00
	C	7,00 ± 2,39 ^e	3,00	10,00

Grupos con letras diferentes (superíndice) tienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Ver Tabla 2 para definición de grupos.

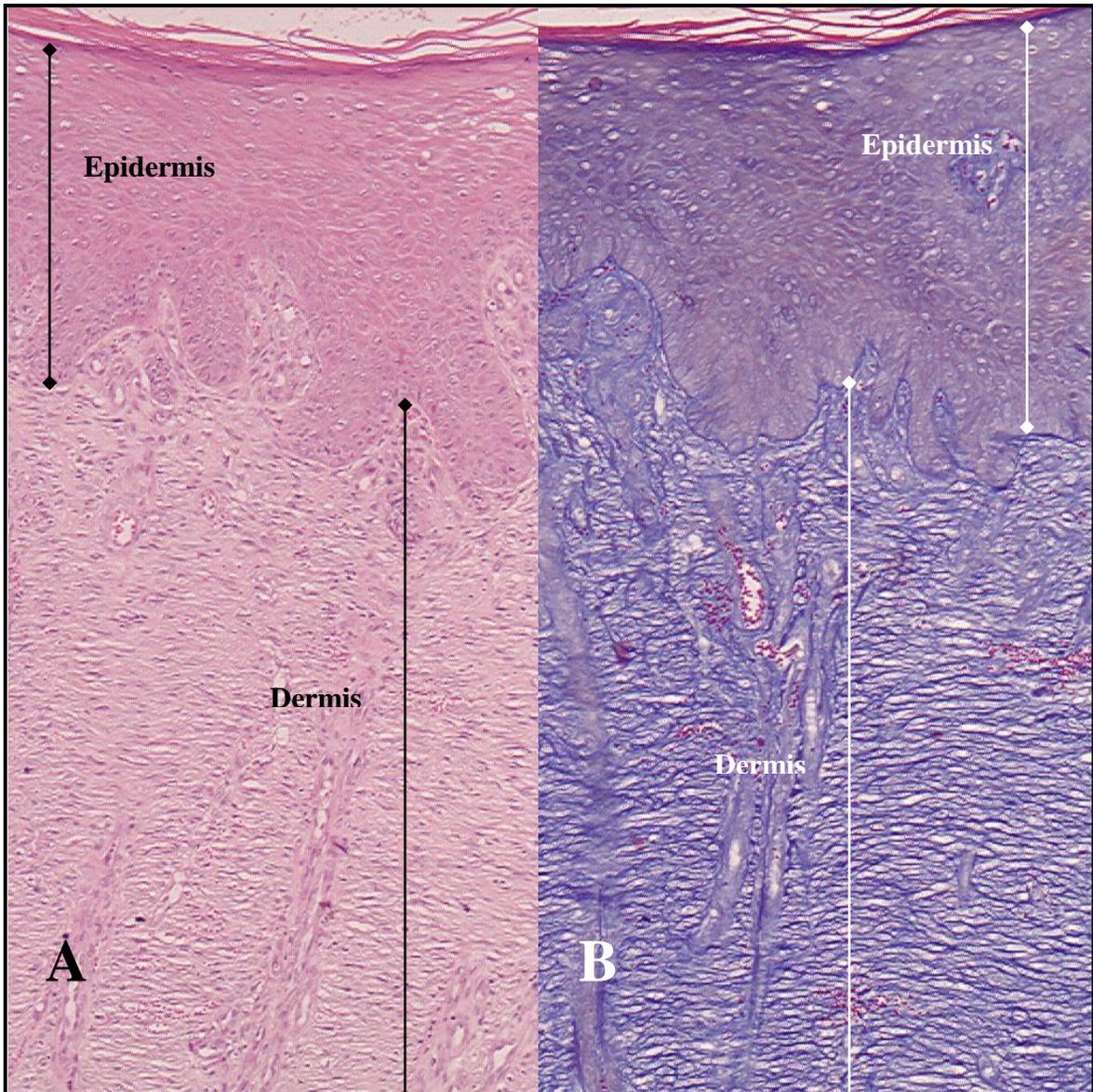


Figura 10. Microfotografía de una biopsia obtenida de la cicatriz de una herida vendada con parche de amnios. En esta imagen se aprecian las dos capas de la piel con tinciones de Hematoxilina-Eosina (A) y Mallory (B) 10X.

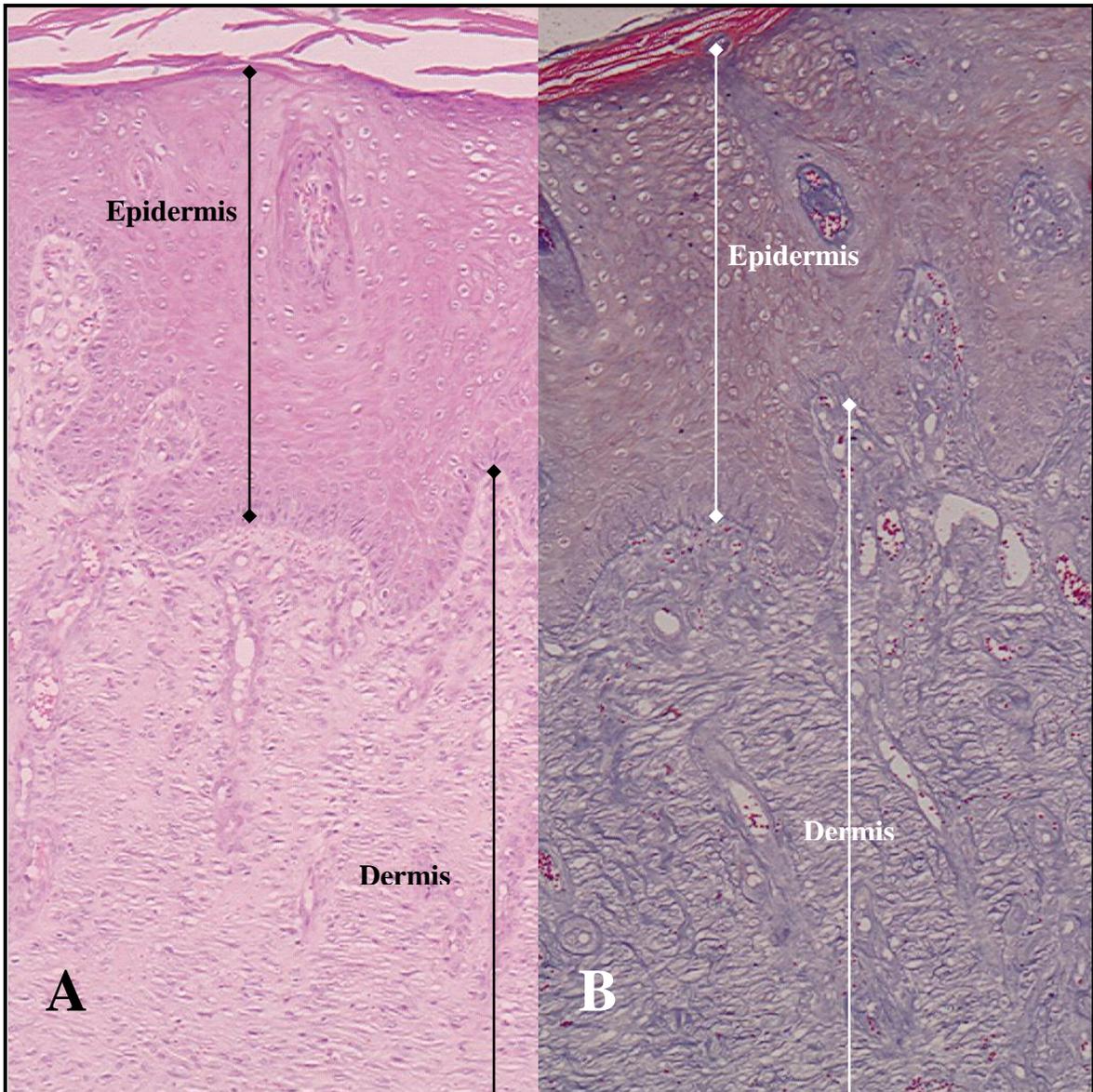


Figura 11. Microfotografía de una biopsia obtenida de la cicatriz de una herida vendada con parche convencional. En esta imagen se aprecian las dos capas de la piel con tinciones de Hematoxilina-Eosina (A) y Mallory (B) 10X.

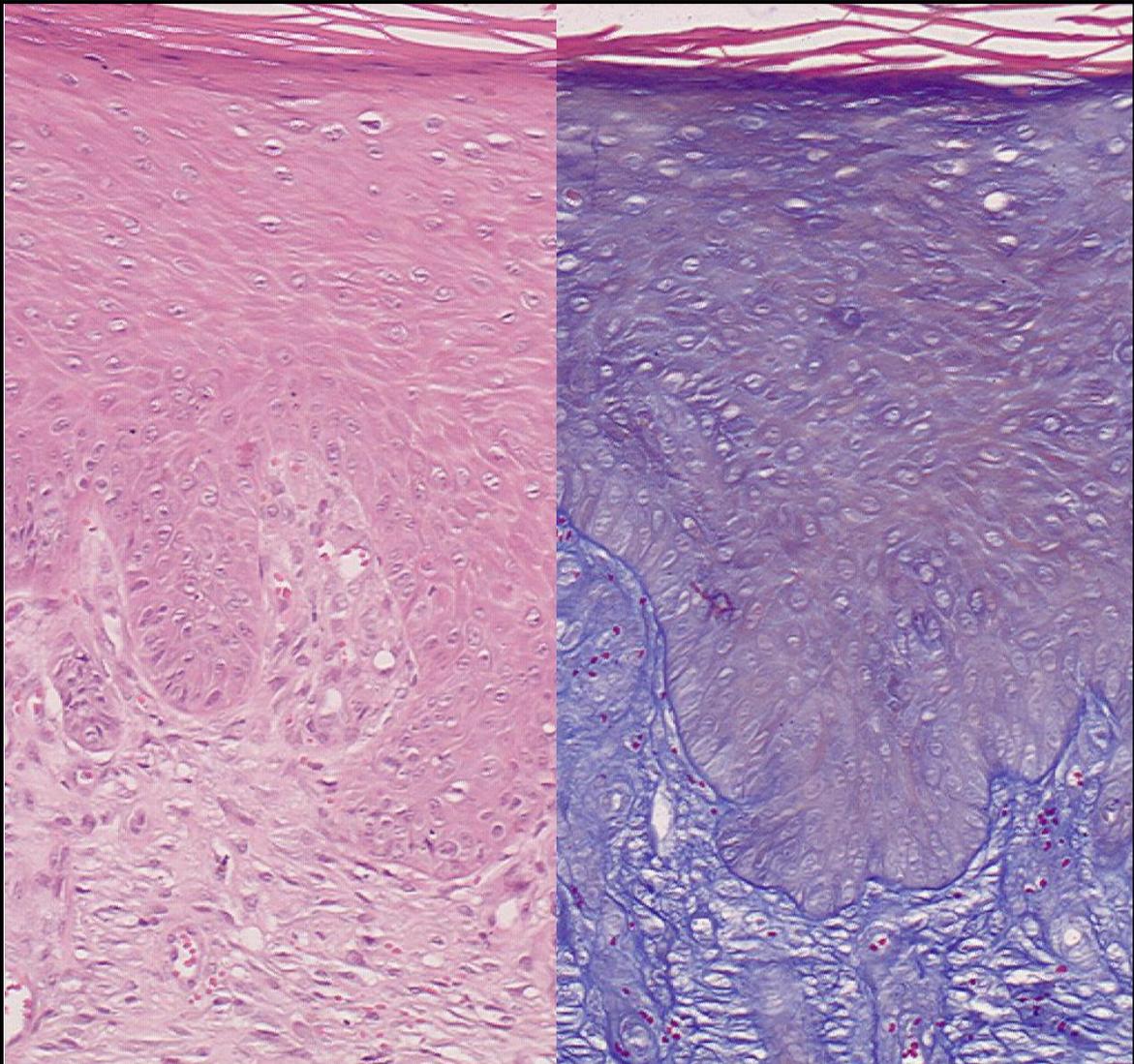


Figura 12. Microfotografía de una biopsia obtenida de la cicatriz de una herida vendada con parche de amnios. En esta imagen se aprecian las dos capas de la piel con tinciones de Hematoxilina-Eosina (A) y Mallory (B) 20X.

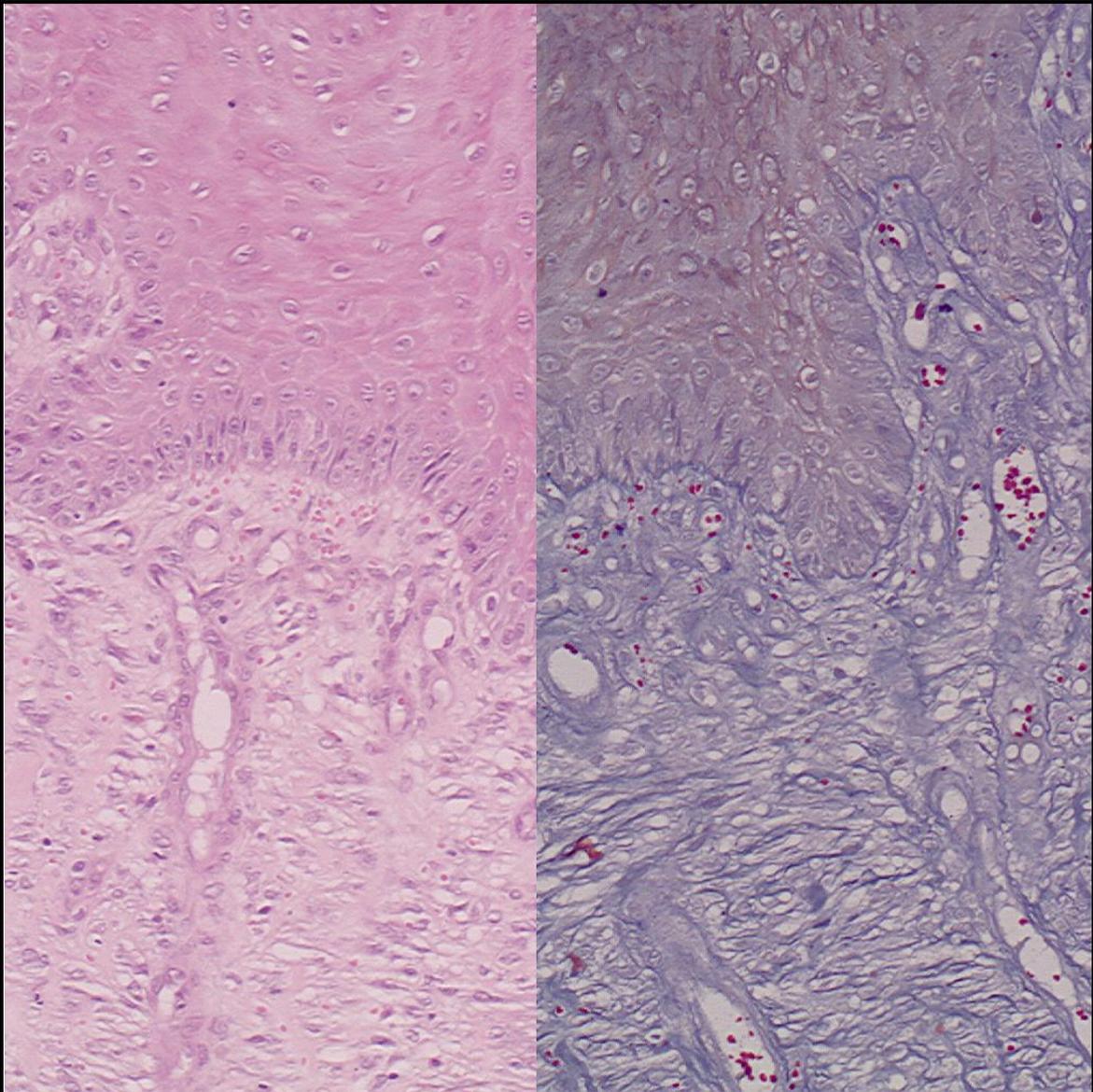


Figura 13. Microfotografía de una biopsia obtenida de la cicatriz de una herida vendada con parche convencional. En esta imagen se aprecian las dos capas de la piel con tinciones de Hematoxilina-Eosina (A) y Mallory (B) 20X.

DISCUSION

Uno de los grandes desafíos que enfrenta el médico veterinario en la práctica equina es el manejo de heridas. Desafortunadamente, la selección del tratamiento a menudo se basa en hábitos o en elegir aquel que sea menos costoso, más que sobre antecedentes científicos, puesto que la investigación en manejo de heridas es escasa en nuestro país. El vendaje ha sido el tratamiento de elección para muchos, los vendajes han sido utilizados para mejorar el proceso cicatricial disminuyendo la contaminación, edema, y exudación; protegiendo del movimiento y de futuros traumas; y modificando la humedad, temperatura, pH, e intercambio gaseoso en el sitio de la herida (**Knottenbelt**, 2003).

En este estudio, se ha querido realizar un modelo de la situación clínica a la que se ve enfrentado día a día el médico veterinario que atiende heridas en caballos, frecuentemente situadas en la parte distal de los miembros y de origen traumática. Lo que hace que la mayoría de estas heridas deban ser tratadas mediante cicatrización por segunda intención. Por lo tanto, realizamos heridas de características similares a las anteriormente descritas.

Elegimos un parche no oclusivo para el vendaje control porque estudios previos (**Howard et al.**, 1993) revelaron que su uso en heridas en los miembros en equinos aceleran de manera significativa la cicatrización, comparado con parches semi-oclusivos u oclusivos, es por esto que este parche es considerado la prueba de oro y es frecuentemente usado en la práctica por los veterinarios de nuestro país.

El parche de amnios fue fácil de utilizar y de almacenar, de bajo costo y bien tolerado por los pacientes; no causó daño en las heridas. Los lavados aplicados a los parches de amnios previo a cada aplicación, no disminuyeron su excelente capacidad adherente.

El día que por primera vez fue visto el nuevo epitelio y el tiempo de cicatrización de las heridas vendadas con parche convencional, fueron similares a lo descrito en trabajos anteriores (**Bigbie et al.**, 1991) (**Schwartz et al.**, 2002) para heridas de las mismas características a las empleadas en este estudio.

El día que por primera vez fue visto el nuevo epitelio, no mostró diferencias significativas entre grupos.

En este estudio, al igual que en estudios previos en ponis (**Goodrich et al.**, 2000), el parche de amnios aceleró el tiempo de cicatrización de las heridas en comparación con los parches convencionales. Las heridas que fueron vendadas con amnios cicatrizaron en promedio 12 días más rápido que las heridas vendadas con parche convencional ($p < 0,05$).

El período de expansión del área de las heridas fue durante los primeros 4 días, esto se explica por el fenómeno inflamatorio desencadenado por la intervención quirúrgica. En estudios anteriores (**Bigbie et al.**, 1991) el área de la herida permanece en expansión por más tiempo luego de la cirugía, esto se puede explicar porque en esos estudios los ejemplares no estuvieron sometidos a terapia antiinflamatoria post-quirúrgica. Es importante aclarar que el tratamiento no afectó de manera significativa el área de las heridas durante este período.

Durante la mayor parte del estudio la media del área total de las heridas fue significativamente menor en el grupo A que en el grupo C ($p < 0,05$). Los días en que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, la media continuó siendo menor en el grupo A. La explicación de la no existencia de diferencias significativas en estos dos días no es del todo clara, en la literatura consultada no se encontraron respuestas posibles para esta situación.

En este trabajo se observó que los vendajes con amnios superaron notablemente a los vendajes convencionales en prevenir la formación de tejido de

granulación exuberante ($p < 0,05$). Además, se evidenció una mejor calidad del tejido de granulación en las heridas vendadas con amnios en comparación con las del grupo control ($p < 0,05$). La mejor calidad del tejido de granulación se puede traducir en una mayor fuerza de los tejidos. De hecho, si el tejido de granulación inicial está bien organizado, es posible que la matriz de colágeno se establezca en forma ordenada, y por lo tanto con mayor resistencia.

Estudios realizados en humanos sostienen que el empleo de la membrana amniótica sobre heridas en piel producidas por quemaduras, en primer lugar promueve la reparación de heridas y en segundo lugar favorece una menor frecuencia en el cambio de vendajes. Adicionalmente, demostró mayor comodidad al momento del cambio de los vendajes, menor antigenicidad, efectos antimicrobianos, alivio del dolor, reducción de la exudación y de la formación de cicatrices (**Kesting et al.**, 2008). Algunas de estas propiedades o todas ellas en conjunto, podrían ayudar a explicar la mejor calidad del tejido de granulación y el menor porcentaje de heridas con tejido de granulación exuberante dentro del grupo A versus el grupo C. En estudios futuros se podrían evaluar estas propiedades del parche de amnios en la especie equina.

Una parte importante del estudio fue la evaluación, a través de un examen histológico, de la calidad de la cicatriz producida luego de la reparación. Si bien por medio de los análisis previos se ha demostrado que el parche de amnios acelera la reparación, es fundamental comprobar que la cicatriz formada sea de una calidad aceptable y que no aumente el riesgo de fractura del tejido cicatricial ante futuros traumas. Los resultados del examen histológico no revelaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la calidad de la cicatriz, entre grupos. Lo cual indica que el parche de amnios acelera la cicatrización de las heridas sin detrimento de la calidad de ésta.

CONCLUSIÓN

El presente estudio indica que el amnios es un parche biológico que acelera la reparación de la piel cuando es utilizado en heridas de la parte distal de los miembros en caballos.

El método de obtención, procesamiento y almacenamiento del amnios, utilizado en este estudio resultó ser efectivo.

Por lo tanto, los parches de amnios surgen como una alternativa de bajo costo y alta eficiencia para ser usada en la clínica del manejo de heridas en caballos en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

- **Baxter, G.** 1998. Wound Management. In: WHITE N. A.; MOORE J. M. (Eds). Current Techniques in Equine Surgery and Lameness. 2a edición. W. B. Saunders Company. USA. pp.72-80.
- **Bertone, A.** 1989. Management of exuberant granulation tissue. Veterinary Clinics North American: Equine Practice 5: 551-562.
- **Bigbie, R.; Schumacher, J.; Swaim, S.; Purohit, R.; Wright, J.** 1991. Effects of amnion and live yeast cell derivate on second-intention healing in horses. American Journal of Veterinary Research 52: 1376-1382.
- **Britton, J.** 1970. Wound Management in Horses. Journal of the American Veterinary Medical Association 157: 1585-1589.
- **Ducharme-Desjarlais, M.; Céleste, C.; Lepault, E.; Theoret, C.** 2005. Effect of a silicone-containing dressing on exuberant granulation tissue formation and wound repair in horses. American Journal of Veterinary Research 66: 1133-1139.
- **Gomez, J.; Hanson, R.** 2005. Use of dressing and bandages in equine wound management. Veterinary Clinics Equine Practice 21: 91-104.
- **Goodrich, L.; Moll, H.; Crisman, M.; Lessard, P.; Bigbie, R.** 2000. Comparison of equine amnion and nonadherent wound dressing material for bandaging pinch-grafted wounds in ponies. American Journal of Veterinary Research 61:326-329.

- **Hanson, R.** 2006. New concepts in the treatment of large avulsion wounds of the distal extremities. In: [52 Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners – AAEP - San Antonio, Texas, USA.](http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2006/theoret/chapter.asp?LA=1) <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2006/theoret/chapter.asp?LA=1>> (24 de marzo de 2007).
- **Howard, R.; Stashak, T.; Baxter, G.** 1993. Evaluation of occlusive dressing for Management of full thickness excisional wounds on the distal portion of the limbs of horses. *American Journal of Veterinary Research* 54: 2150-2154.
- **Kesting, M.; Wolff, K.; Hohlweg-Majert, B.; Steintraesser, L.** 2008. The role of allogenic amniotic membrane in burn treatment. *Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association* 29: 907-916.
- **Knottenbelt, D.** 2003. Basic Wound Management. In: Handbook of Equine Wound Management. W. B. Saunders Company, London. pp. 39-77.
- **Ramsey, D.; Pope, E.; Wagner-Mann, C.; Berg, J.; Swaim, S.** 1995. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wound in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 56:941-949.
- **Rees, C.** 2004. Disorders of the Skin. In: Reed, S.; Bayly, W.; Sellon, D. (Eds.) Equine Internal Medicine. 2nd Edition. W. B. Saunders Company. USA. pp.667-669.
- **Riegel, R.; Hakola, S.** 2003. The Skin. In: Illustrated Atlas of Clinical Equine Anatomy and Common Disorders of the Horse. 1st Ed. Equistar Publications, Ohio. p.p.294-306.

- **Ross, M.; Kaye, G.; Wojciech, P.** 2002. Integumentary system. In: Histology. A Text and Atlas. 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins. p.p. 400-432.
- **Shwartz, A.; Wilson, D.; Keegan, K.; Ganjam, V.; Sun, Y; Weber, K.; Zhang J.** 2002. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wound in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. American Journal of Veterinary Research 63: 1564-1570.
- **Theoret, C.** 2006. What's New and Innovative in wound Management: Problems and Solutions. In: [52 Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners – AAEP - San Antonio, Texas, USA.](#) <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2006/theoret/chapter.asp?LA=1>> (24 de marzo de 2007).
- **Wilmink, J.; Stolk, P.; van Weeren, P.; Barneveld, A.** 1999. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopical aspects. Equine Veterinary Journal 31: 53-60.
- **Wilmink, J.; van Weeren, P.** 2005. Second-Intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. Veterinary Clinics Equine Practice 21: 15-32.

Anexo 1

FICHA CLÍNICA

Ficha N °:

FECHA: / /

NOMBRE:

EDAD:

SEXO:

RAZA:

COLOR:

PESO:

PROCEDENCIA:

EXAMEN CLÍNICO

Actitud:	Pliegue cutáneo:
Mucosas:	Frecuencia cardiaca:
Tiempo de Llenc Capilar:	Frecuencia respiratoria:
Flujo yugular:	Temperatura rectal:
Observaciones:	

Anexo 2

CERTIFICADO N° 002

Con relación a los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales en el Anteproyecto titulado **“EFECTO DEL AMNIO EQUINO SOBRE LA FORMACIÓN DEL TEJIDO DE GRANULACIÓN Y LA REPARACIÓN DE HERIDAS EN CABALLOS”**, cuyo Investigador Responsable es el Sr. ENRIQUE PINTO, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que este satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigaciones Biomédicas, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité.


Dr. HÉCTOR ALCAÍNO CONTADOR CANO
Decano
Presidente
Comité de Bioética Animal



Santiago, junio 4 de 2007

Anexo 3

Nº Informe	: 190
Fecha	: 22.01.2008
Fax	:
Ficha	:

IDENTIFICACIÓN	: Equino
PROPIETARIO	: Rodrigo Díaz Ledezma
TIPO DE MUESTRA	: Placenta (amnios)
EXAMEN SOLICITADO	: Microbiológico
M. VETERINARIO TRATANTE	: Dr. Enrique Pinto

RESULTADOS

Al cultivo para bacterias aerobias y facultativas, las tres muestras de amnios resultaron negativas a desarrollo bacteriano.

ANTIBOGRAMA:

Ac. Nalidixico		Ampicilina		Cefradina 25/31	
Cloramfenicol		Cloxacilina		Doxiciclina 20/22	
Enrofloxacino		Eritromicina		Gentamicina 17/15	
Neomicina		Penicilina		S. + Trimetoprim	
Tetraciclina		Cefotaxima		Amox. + Ac. Clavulánico	
Lincomicina		Cefadroxilo		Azitromicina	

S: SENSIBLE

SI: SENSIBILIDAD INTERMEDIA

R: RESISTENTE



Anexo 4

PAUTA DE EVALUACIÓN A CADA CAMBIO DE VENDAJE

FECHA: / /

CABALLO	Miembro	Área (mm²)	Observaciones (tratamiento farmacológico, aparición nuevo epitelio, cicatrización completa, características del exudado, etc.)
1	MAD		
1	MAI		
2	MAD		
2	MAI		
3	MAD		
3	MAI		
4	MAD		
4	MAI		
5	MAD		
5	MAI		
6	MAD		
6	MAI		
7	MAD		
7	MAI		
8	MAD		
8	MAI		

Anexo 5

EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE RESECCIÓN

CABALLO	TTO	D		Í				A				S				Σ								
		0	1	4	7	9	11	15	18	21	25	28	30	32	35		39	43	46	50	53	57	60	63
1	A																							
1	C																							
2	A																							
2	C																							
3	A																							
3	C																							
4	A																							
4	C																							
5	A																							
5	C																							
6	A																							
6	C																							
7	A																							
7	C																							
8	A																							
8	C																							

Se marcará con un ticket (✓) el día en que se escinda el tejido de granulación exuberante grados 3 y 4, según la escala predeterminada por Goodrich et al.

Anexo 6

PAUTA DE EVALUACIÓN DEL TEJIDO DE GRANULACIÓN

Dr. Arnaldo Croxatto Alarcón.

Protuberancia de TG	Calidad del TG	Color del TG
0 = Nada	0 = Plano	0 = Rosado
1 = Medio	1 = Rugoso	1 = Amarillo o rojo
2 = Marcada		oscuro

Fotografía N °												
Grado de inflamación												
Angiogénesis												
Fibrosis												
Hiperplasia epitelial												

Muestra N °												
Grado de inflamación												
Angiogénesis												
Fibrosis												
Hiperplasia epitelial												

Muestra N °												
Grado de inflamación												
Angiogénesis												
Fibrosis												
Hiperplasia epitelial												

Anexo 7

PAUTA DE EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Dr. Julio Larenas Herrera

Grado de Inflamación	Angiogénesis	Fibrosis	Hiperplasia epitelial
0 = Nada	0 = Nada	0 = Nada	0 = Nada
1 = Mínima	1 = Mínima	1 = Mínima	1 = Mínima
2 = Moderada	2 = Moderada	2 = Moderada	2 = Moderada
3 = Marcada	3 = Marcada	3 = Marcada	3 = Marcada

Muestra N °	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Grado de inflamación										
Angiogénesis										
Fibrosis										
Hiperplasia epitelial										

Muestra N °	11	12	13	14	15	16
Grado de inflamación						
Angiogénesis						
Fibrosis						
Hiperplasia epitelial						