

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**



TESIS DOCTORAL

**Microbiología de heridas contaminadas/infectadas con y sin el
uso de un láser terapéutico clase IV en pacientes caninos:
ensayo clínico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Samuel Rico Holgado

Directores

**María del Carmen Martín Espada
María Suárez Redondo
Gustavo Ortiz Díez**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS

DEPARTAMENTOS DE SANIDAD ANIMAL Y MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL



**MICROBIOLOGÍA DE HERIDAS
CONTAMINADAS/INFECTADAS CON Y SIN EL USO DE UN
LÁSER TERAPÉUTICO CLASE IV EN PACIENTES CANINOS.
ENSAYO CLÍNICO**

SAMUEL RICO HOLGADO

DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL:

DRA. MARÍA DEL CARMEN MARTÍN ESPADA

DRA. MARÍA SUÁREZ REDONDO

DR. GUSTAVO ORTIZ DÍEZ

MADRID, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Samuel Rico Holgado,
estudiante en el Programa de Doctorado en Veterinaria,
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Microbiología de heridas contaminadas/infectadas con y sin el uso de un láser terapéutico Clase IV
en pacientes caninos. Ensayo Clínico.

y dirigida por: Dra. María Del Carmen Martín Espada, Dra. María Suárez Redondo y Dr. Gustavo
Ortiz Díez

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 14 de junio de 2019

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Nada sería como es si no fuera por ellos.

A mis padres, Ramón y Manoli, porque son ejemplo de amor, esfuerzo y constancia. Gracias por vuestro apoyo y consejos.

A mi hermano Alberto, porque tus pisadas tapan las huellas que he dejado y eso me enorgullece y me motiva a seguir creciendo.

A Rocío, porque las carreteras son infinitas junto a ti.

Agradecimientos

A la Dra. María del Carmen Martín Espada, por aceptar y dirigir este proyecto. Ejemplo de motivación y pasión por su trabajo. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de lograr este objetivo.

A la Dra. María Suárez Redondo, por codirigir el presente trabajo. Sin tu ayuda y conocimientos todo habría sido mucho más difícil. Gracias por enseñarme todo lo que sé al respecto, por tu constancia en el trabajo y por tu apoyo.

Al Dr. Gustavo Ortiz Díez, por codirigir el presente trabajo. Gracias por ofrecerme la oportunidad de comenzar en el mundo de la investigación, por presentarme a Carmen y María y por enseñarme como aprender.

A cada uno de mis compañeros del HCV-UAX, porque tanto en lo profesional como en lo personal siempre habéis sumado. Especial agradecimiento al director del hospital, el Dr. Fernando Vázquez Fernández, y a la Dra. María Rosario Baquero Artigao, vicedecana de la Facultad de Ciencias de la Salud y profesora del Servicio de Microbiología. Y por supuesto, a los que no solo han sido compañeros, sino que también son amigos: Raúl, Lorena, Eduardo, María y José Luis, y a los que he conocido gracias a ellos como Jorge, Noemí y Borja.

Al Dr. José Luis Blanco Cancelo, por abrirme las puertas del Servicio de Microbiología y Parasitología (Departamento de Sanidad Animal) del HCVC, donde he podido desarrollar gran parte del presente trabajo. Del mismo modo, quiero dar las gracias a cada uno de los compañeros que forman parte del servicio.

A cada uno de los propietarios que aceptaron participar en el presente trabajo, sin sus mascotas nada habría sido posible. Gracias por confirmar en mí.

Muchas gracias a D. Santiago Francisco Umbert y AVANVET por la cesión del equipo que nos ha permitido llevar a cabo las terapias láser.

También me gustaría acordarme de cada uno de los compañeros que han formado parte del camino que comencé en Cáceres en septiembre de 2007. A día de hoy, muchos de ellos son también amigos. Y por supuesto a los de toda la vida, desde

los amigos del “Pipero” hasta los del “Equipo Actimel”, porque he tenido la suerte de rodearme de los mejores.

A mis compañeros actuales de Vetsia (y “allegados”), quienes en tan solo 9 meses me han demostrado que son una familia y que formo parte de ella.

A Rocío, sinónimo de amistad, complicidad, generosidad, paciencia y motivación. Porque te tocó la parte dura de soportarme. Gracias por cada día que me regalas.

Por último, me gustaría volver a agradecerse a mi familia, por quererme, apoyarme y aconsejarme. Porque sé que no es fácil, pero siempre estáis cuando lo necesito, y desde la distancia os siento cerca, siempre lo he sentido y por eso os quiero. Esto es por y para vosotros.

*Sólo aquellos que se atreven a sufrir grandes fracasos
son capaces de conseguir grandes éxitos.*

Will Smith

Índice

I. Resumen.....	1
II. Summary.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Terapia láser. Antecedentes históricos	11
1.1.1. Evolución de la terminología.....	14
1.2. Qué es y cómo funciona un láser	15
1.2.1. Parámetros físicos de la radiación emitida	16
1.2.2. Cómo emite luz un átomo.....	18
1.2.3. Componentes de un equipo láser	19
1.3. Clasificación de los equipos láser	21
1.3.1. Peligrosidad y medidas de precaución	23
1.4. Parámetros de tratamiento	24
1.5. Interacción de la luz con el paciente a nivel molecular y celular	26
1.5.1. Absorción vs dispersión	26
1.5.2. Cromóforos - efectos moleculares y celulares	28
1.6. Aplicaciones de la terapia láser: efectos fisiológicos en el paciente.....	35
1.6.1. Regeneración tisular – Cicatrización de heridas.....	36
1.6.2. Antiinflamatorio	37
1.6.3. Analgesia	38
1.6.4. Contraindicaciones y precauciones de la terapia láser.....	40
1.7. Heridas	43
1.7.1. Proceso de cicatrización.....	43
1.7.2. Sistema de clasificación de las heridas	45
1.7.3. Heridas traumáticas contaminadas.....	45
1.7.4. Uso de la terapia láser en el manejo de heridas	47
1.7.5. Posible efecto antimicrobiano de la terapia láser	49
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
2.1. Hipótesis	55
2.2. Objetivos	55
2.2.1. Objetivos principales	55
2.2.2. Objetivo secundario	55
3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1. Ensayo <i>in-vivo</i>	59
3.1.1. Diseño del estudio	59
3.1.2. Población del estudio	60
3.1.3. Definición de variables	61
3.1.4. Aspectos generales.....	65
3.1.5. Toma de muestras	68

3.1.6. Terapia láser (TL)	69
3.1.7. Manejo estándar	74
3.1.8. Manejo adicional	75
3.1.9. Microbiología	76
3.1.10. Valoración de heridas	79
3.1.11. Seguimiento de los pacientes.....	80
3.2. Ensayo <i>in-vitro</i>	80
3.2.1. Diseño del estudio	80
3.2.2. Definición de variables	80
3.2.3. Preparación de los medios de irradiación	81
3.2.4. Aplicación de la terapia láser	83
3.2.5. Procesado de las muestras.....	83
3.3. Análisis estadístico	83
3.3.1. Análisis estadístico del ensayo <i>in-vivo</i>	83
3.3.2. Análisis estadístico del ensayo <i>in-vitro</i>	84
4. RESULTADOS	87
4.1. Ensayo <i>in-vivo</i>	89
4.1.1. Variables clínicas generales.....	89
4.1.2. Variables específicas de la herida.....	91
4.1.3. Variables específicas del tratamiento.....	92
4.1.4. Variables microbiológicas	95
4.1.5. Análisis univariable	97
4.1.6. Análisis multivariable	102
4.1.7. Identificación bacteriana	103
4.1.8. Valoración visual de las heridas	106
4.2. Ensayo <i>in-vitro</i>	108
5. DISCUSIÓN	113
5.1. Discusión del ensayo <i>in-vivo</i>	115
5.1.1. Discusión del material y métodos	115
5.1.2. Discusión de la importancia de las heridas Clase III y su correcto manejo	116
5.1.3. Discusión del empleo, parámetros y método de irradiación de la terapia láser sobre heridas Clase III	120
5.1.4. Discusión de la toma de muestras y su procesado.....	123
5.1.5. Discusión de las variables clínicas generales.....	124
5.1.6. Discusión de las variables específicas de la herida.....	125
5.1.7. Discusión de las variables específicas del tratamiento.....	125
5.1.8. Discusión de las variables microbiológicas	126
5.1.9. Discusión de los resultados microbiológicos obtenidos	126
5.1.10. Discusión de los resultados obtenidos en la valoración de las heridas	128
5.1.11. Discusión de los resultados obtenidos a partir del modelo multivariable.....	129
5.1.12. Discusión del posible efecto antimicrobiano de la terapia láser.....	131
5.2. Discusión del ensayo <i>in-vitro</i>	132
5.2.1. Discusión del material y métodos	132
5.2.2. Discusión de los resultados obtenidos en el ensayo <i>in-vitro</i>	134

5.3. Análisis complementario	136
6. CONCLUSIONES	139
7. ANEXOS	143
7.1. Índice de abreviaturas y acrónimos	145
7.2. Índice de figuras, tablas y documentos adjuntos	149
8. BIBLIOGRAFÍA	157

I. Resumen

INTRODUCCIÓN

Low Level Laser Therapy – LLLT (terapia láser de bajo nivel), denominada en castellano como Terapia Láser (TL), es una modalidad de tratamiento médico no invasivo, versátil, libre de fármacos y seguro que puede llegar a ser de gran valor tanto en medicina humana como veterinaria. En veterinaria se trata de una técnica médica reciente en la que se centran actualmente varios estudios y que poco a poco tiene mayor cabida y aceptación en la práctica clínica.

El modo de actuación de este método terapéutico parte de los cromóforos celulares, como son el agua, la hemoglobina y la citocromo-c-oxidasa entre otros, que absorben la energía de la luz láser. Esto da lugar a una mejora de la eficiencia de la cadena respiratoria, que conduce a un aumento de la síntesis de ATP, así como especies de oxígeno reactivas (ROS). Además, puede tener lugar una cascada de efectos secundarios como la síntesis de ADN y ARN, activación de fibroblastos, macrófagos y linfocitos, liberación de factores de crecimiento, liberación de neurotransmisores, vasodilatación y síntesis de colágeno.

El efecto antiinflamatorio y de cicatrización de heridas son probablemente los más documentados de la TL. La estimulación celular secundaria a la TL permite un aumento de la actividad metabólica, lo cual da lugar a una mejora de los mecanismos naturales de reparación tisular y modulación de la respuesta inflamatoria. Otro efecto con gran repercusión clínica como es la analgesia también está atribuido, con un menor número de referencias bibliográficas, a la TL.

El proceso de cicatrización de una herida depende de muchos factores, siendo las infecciones la condición más común a la hora de retrasar una correcta evolución de las mismas. Esto supone un punto crítico en la práctica médica debido a la importante causa de morbilidad y mortalidad que representan.

A pesar del importante conocimiento actual en cuanto al manejo de las heridas infectadas se refiere, la creciente preocupación acerca del uso de antibióticos y la aparición de resistencias a los mismos, ha hecho ver en la TL una herramienta complementaria a los tratamientos antimicrobianos convencionales. Es por eso que, en

las últimas décadas, son muchos los científicos y clínicos que pretenden entender y mostrar los posibles efectos de la luz láser sobre los microorganismos.

Actualmente existen varias controversias al respecto debido en gran parte a la multitud de parámetros de tratamiento empleados, así como a las diferentes metodologías de ensayos. En medicina veterinaria, los resultados obtenidos acerca del potencial efecto antimicrobiano de la TL se limitan principalmente a modelos *in-vitro* o a ensayos con animales de experimentación.

Hasta la fecha, no hay ningún estudio prospectivo que evalúe la actividad antimicrobiana del láser sobre heridas contaminadas/infectadas en pacientes caninos.

OBJETIVOS

Evaluar el efecto antimicrobiano de un equipo láser Clase IV como terapia coadyuvante a un tratamiento convencional y estandarizado sobre heridas contaminadas en pacientes caninos. Además, se pretendió evaluar el efecto directo de la luz láser sobre dos modelos bacterianos en un estudio experimental *in-vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el ensayo *in-vivo* se realizó un estudio prospectivo, controlado, aleatorizado, ciego del observador y análisis enmascarado, dividido en tres grupos paralelos (Grupo A – 6 J/cm², Grupo B – 2 J/cm², Grupo C – Placebo).

Para cada una de las heridas incluidas en el ensayo se realizó la toma de una muestra microbiológica, previa a cualquier tratamiento, los días 0 y 2, y que se cultivaron en dos medios distintos: agar Sangre y agar MacConkey. Todos los pacientes recibieron, junto con el antibiótico y el manejo estándar de las heridas, la TL correspondiente a su grupo de ensayo los días 0, 1 y 2. Además, cada herida fue fotografiada al finalizar la TL cada uno de los días del ensayo.

A partir de los resultados obtenidos se evaluó el efecto de la TL sobre el número de unidades formadoras de colonias (UFC) comparando los cultivos del día 0 con los del día 2. Por otro lado, se valoró la evolución de las heridas mediante el uso de una escala modificada a partir de la propuesta por Falanga y cols.¹ mediante la observación de las fotografías.

Para el ensayo *in-vitro* se realizó un estudio experimental donde se aplicaron 5 TL distintas sobre diluciones de dos modelos bacterianos: *Staphylococcus intermedius* y *Escherichia coli*. Tras el cultivo de las bacterias se analizó el efecto de la TL a partir de la comparación y análisis estadístico de las UFC de las placas de siembra de los distintos grupos.

Para evaluar los resultados de los ensayos se utilizó un análisis de regresión lineal univariable, mientras que para el ensayo *in-vivo* además se empleó un modelo de regresión lineal multivariable.

RESULTADOS

Se incluyeron en el ensayo *in-vivo* un total de 14 pacientes caninos de propietarios. El Grupo A contó con 4 pacientes, mientras que el Grupo B y C contaron con 5 pacientes cada uno de ellos. Tan solo una herida de cada uno de los pacientes fue incluida en el ensayo.

Se observó un decremento relativo de la media del logaritmo neperiano del número de colonias en los cultivos de agar Sangre a las 72 horas del 79% y 93% para el Grupo A y B respectivamente con respecto al Grupo C, con un valor estadísticamente significativo para el Grupo B ($\beta = -2,73$, IC95% $-4,36 - [-]1,09$; $p=0,001$). Estos resultados no se obtuvieron para los cultivos en agar MacConkey. Además, se observó una disminución de la puntuación media en la escala de valoración de las heridas en ambos grupos de ensayo (Grupo A y B) con respecto al grupo control (Grupo C), con un valor estadísticamente significativo para las heridas de los pacientes pertenecientes al Grupo B ($\beta = -0,310$, IC95% $0,361-2,239$; $p=0,011$).

Los análisis del estudio experimental *in-vitro* mostraron que para el *S. intermedius* los parámetros de terapia de: 2 J/cm^2 , 3 W de potencia media, 50 Hz de frecuencia y cuatro longitudes de onda (660, 800, 905 y 970 nm), y la dosis por separado de 2 J/cm^2 , mostraron un incremento significativo de la media del 98% del número de colonias para los cultivos en agar Sangre ($\beta = 0,683$, IC95% $0,030-1,339$; $p=0,042$ y $\beta = 0,683$, IC95% $0,047-1,320$; $p=0,037$, respectivamente). Estos resultados no se observaron para los cultivos de *E. coli*.

CONCLUSIONES

La terapia láser, con los parámetros propios del ensayo, junto con un antibiótico y un manejo estándar de las heridas contaminadas/infectadas de los pacientes caninos, disminuye la carga bacteriana de las mismas. Además, su efecto favorece una mejoría en la puntuación de las heridas según la escala empleada.

Con los parámetros de tratamiento empleados en el estudio experimental *in-vitro* podemos concluir que la TL no presenta un efecto inhibitorio directo sobre los dos modelos bacterianos empleados. Esto nos permite suponer, *a priori*, que el decremento de la media de UFC observado en nuestro ensayo *in-vivo*, pueda ser debido a un efecto indirecto por parte de la TL junto con el tratamiento estandarizado para cada paciente. La mejora de las condiciones locales de la herida, así como de la respuesta inmune del organismo, podrían ser las principales causas de dicho efecto.

II. Summary

INTRODUCTION

Low Level Laser Therapy (LLLT), referred to as “Terapia Láser” (TL) in Spanish, is a non-invasive, versatile, drug-free and safe medical treatment modality that can be of great value in both human as well as veterinary medicine. In veterinary science, several studies are currently focusing on this recent medical technique which, step by step, has gained importance and acceptance in clinical practice.

This therapeutic method’s course of action is based on cellular chromophores, such as water, hemoglobin and cytochrome-c-oxidase, among others, which absorb laser light. This results in an improvement in the efficiency of the respiratory chain, which leads to an increase in the synthesis of ATP, as well as reactive oxygen species (ROS). In addition, a cascade of secondary effects such as DNA and RNA synthesis, activation of fibroblasts, macrophages and lymphocytes, release of growth factors, release of neurotransmitters, vasodilation and collagen synthesis can take place.

The anti-inflammatory and wound healing effects are probably the most documented of LLLT. The cellular stimulation secondary to LLLT allows an increase in metabolic activity, which results in an improvement of the natural mechanisms of tissue repair and modulation of the inflammatory response. Another effect, one with great clinical repercussion such as analgesia, is also attributed, with a lower number of bibliographic references, to LLLT.

The healing process of a wound depends on many factors, however its evolution is mainly affected by infections, the most common condition which therefore delays the healing process. This is extremely important within the medical practice because of the high risk of morbidity and mortality that they represent.

Despite the large amount of current knowledge regarding the management of infected wounds, the growing concern regarding the use of antibiotics and the emergence of resistance to them has pointed to LLLT as a complementary tool to conventional antimicrobial treatments. That is why, in recent decades, many scientists

and clinicians have tried to understand and show the possible effects of laser light on microorganisms.

There are currently several controversies regarding the use of LLLT; one of the main reasons is the multitude of treatment parameters employed, and the different study methodologies as well. In veterinary medicine, the results obtained from the potential antimicrobial effects of LLLT are limited to in-vitro models or studies with experimental animals.

To date, there is no prospective study evaluating the antimicrobial activity of the laser on contaminated/ infected wounds in canine patients.

OBJECTIVES

To evaluate the antimicrobial effect of a Class IV laser equipment as an adjuvant therapy to a conventional and standardized treatment for contaminated wounds in canine patients. In addition, we aimed to evaluate the direct effect of laser light on two bacterial models in an experimental in-vitro study.

MATERIAL AND METHODS

For the in-vivo clinical trial, a prospective, controlled, randomized, blind study to the observer and masked analysis was performed, divided into three parallel groups (Group A – 6 J/cm², Group B - 2 J/cm², Group C - Placebo).

For each of the wounds included in the study, a microbiological sample was taken, prior to any treatment, on days 0 and 2, and they were cultured in two different culture plates: Blood agar and MacConkey agar. All patients received, along with the antibiotic and standard wound management, the LLLT corresponding to their study group on days 0, 1 and 2. In addition, each wound was photographed once the LLLT was finished each and every day of the clinical trial.

From the obtained results, the effect of LLLT on the number of colony forming units (CFU) was evaluated by comparing the cultures of day 0 with those of day 2.

Additionally, the evolution of the wounds was evaluated using a scale modified from the one proposed by Falanga et al.¹ through the observation of photographs.

For the in-vitro test an experimental study was carried out in which 5 distinct LLLT protocols were applied on dilutions of two bacterial models: *Staphylococcus intermedius* and *Escherichia coli*. After bacterial culture, the effect of LLLT was analyzed from the comparison and statistical analysis of the CFUs of the culture plates of the different groups.

A univariable linear regression analysis was used to evaluate the results of both studies, while a multivariable linear regression model was used for the in-vivo test.

RESULTS

A total of 14 canine owner patients were included in the in-vivo clinical trial. Group A had 4 patients, while Groups B and C had 5 patients each. Only one wound from each of the patients was included in the clinical trial.

A relative decrease in the mean of the Neperian logarithm of the number of colonies in the Blood agar cultures was observed at 72 hours of 79% and 93% for Group A and B respectively with respect to Group C, with a statistically significant value for Group B ($\beta = -2.73$, IC95% $-4.36 - [-] 1.09$, $p=0.001$). These results were not obtained for MacConkey agar cultures. In addition, a decrease in the mean score on the scale of wound assessment was observed in both test groups (Group A and B) with respect to the control group (Group C), with a statistically significant value for the wounds of the patients belonging to Group B ($\beta = -0.310$, 95% CI $0.361-2.239$, $p=0.011$).

The analysis of the in-vitro experimental study showed that for the *S. intermedius* the therapy parameters of: 2 J/cm², 3 W of average power, 50 Hz of frequency and four wavelengths (660, 800, 905 and 970 nm), and the separate dose of 2 J/cm², showed a significant increase of the mean of 98% of the number of colonies for Blood agar cultures ($\beta = 0.683$, 95% CI $0.030-1.339$, $p=0.042$ and $\beta = 0.683$, 95% CI $0.047-1.320$, $p=0.037$, respectively). These results were not observed for *E. coli* cultures.

CONCLUSIONS

Laser therapy, with the parameters applied in this clinical trial, together with an antibiotic and a standard management of the contaminated/infected wounds of canine patients, decreases bacterial load of the wounds. In addition, its effect favors an improvement in the score of the wounds according to the scale used.

With the treatment parameters utilized in the in-vitro experimental study, we can conclude that LLLT does not have a direct inhibitory effect on the two bacterial models used. This allows us to suppose, a priori, that the decrease in the mean CFU observed in our in-vivo clinical trial could be due to an indirect effect on the part of the LLLT together with the standardized treatment for each patient. The improvement of the local conditions of the wound, as well as the immune response of the organism, could be the main causes of this effect.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TERAPIA LÁSER. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La terapia láser (TL) es un tipo de terapia médica que utiliza la energía entregada por billones de fotones de luz a un foto-receptor, que absorbe esta energía, produciendo cambios biológicos que originan un efecto terapéutico.

Su versatilidad y seguridad de tratamiento han hecho que se haya convertido en una importante herramienta de trabajo en la práctica clínica.^{2,3} Los primeros usos experimentales datan de los años 60 y las aplicaciones médicas fueron describiéndose a partir de los años 80, inicialmente de forma anecdótica pero con una frecuencia cada vez mayor y especialmente en los últimos 15 años, con el desarrollo de equipos de mayor potencia. Algunos de estos efectos beneficiosos incluyen la disminución del dolor y/o inflamación, inmunomodulación y la regeneración tisular entre otros.⁴⁻⁷

La aplicación de la luz láser con fines médicos es el resultado de un largo camino de descubrimientos en el mundo de la física y la medicina, comenzando por Niels Ryberg Finse (1860-1904), físico danés que recibió en 1903 el premio Nobel de Medicina y Fisiología por su contribución en el tratamiento de enfermedades, especialmente el *lupus vulgaris* originado por *Mycobacterium tuberculosis*. En su teoría de fototerapia mostró cómo ciertas longitudes de onda de luz visible presentaban efectos médicos beneficiosos en el tratamiento de determinadas lesiones cutáneas.

En 1915, Albert Einstein (1879-1955) utilizó por primera vez el término “emisión estimulada”. Un año después, postuló la teoría de luz láser que apoyaría su teoría de la relatividad. Dicha teoría la creó a partir de la ley de radiación de Max Planck (1858-1947) basada en los conceptos de emisión espontánea y estimulada de radiación. El proceso de emisión estimulada tiene varias consecuencias, siendo una de las más relevantes la existencia del láser. Max Planck recibió en 1918 el premio Nobel de Física por el descubrimiento de la mecánica cuántica.

Las teorías de Planck y Einstein sirvieron a Theodore Maiman (1927-2007), físico norteamericano perteneciente a la *Hughes Aircraft Co.*, para construir el primer láser de medio sólido (cristal de rubí) en 1960. Maiman empleó ese primer prototipo de equipo láser para eliminar un pequeño tumor de la retina de un paciente. Ese mismo año, los científicos Ali Javan, William Bennett Jr. y Donald Herriott, trabajadores de la *Bell*

Telephone Laboratories, desarrollaron un modelo similar con base gaseosa de Helio y Neón (He-Ne).

En los primeros años de la década de 1960, muchos científicos siguieron experimentando con diferentes tipos de materiales que pudieran emitir luz. Apenas dos años después de la creación de los láseres de rubí y He-Ne, el físico norteamericano Robert N. Hall (1919-2016) construyó el primer láser de medio semiconductor utilizando Galio y Arsenio (Ga-As).⁸ Estos láseres con base semiconductor posteriormente se denominarían láser de diodo. Un año después, en 1963, un equipo de científicos rusos liderados por Nikolai Basov (1922-2001) utilizaron un láser Ga-As para conseguir emisión de luz. Nikolai Basov obtendría en 1964 el premio Nobel de Física.

El primer uso de luz láser en medicina corrió a cargo del estadounidense Leon Goldman (1906-1997) a principios de los años 60. Su trabajo inicial se centró en la utilización del láser con fines quirúrgicos sobre lesiones cutáneas de pacientes. Algo similar realizó Paul McGuff (1912-2002), quien en 1964 enfocó sus estudios experimentales en el tratamiento del melanoma cutáneo con el uso del láser de rubí.⁹ Este ensayo a su vez sirvió de inspiración al cirujano húngaro Endre Mester (1903-1984), considerado padre de la fotobiomodulación. Mester empleó la terapia láser para tratar un melanoma cutáneo en uno de sus pacientes. El tratamiento fue un fracaso, pero despertó en él la inquietud de investigar sobre el uso de la terapia láser en diferentes tipos de lesiones cutáneas.

En sus primeros ensayos clínicos con ratones observó que con el empleo del láser sobre superficies alopécicas el crecimiento del pelo en aquellos animales que recibían la terapia era más rápido que en aquellos que no recibían irradiación.¹⁰ Además, demostró, en otro ensayo posterior, que el láser He-Ne favorecía la cicatrización de heridas en ratones.¹¹ Después de observar algunos de los efectos beneficiosos de la luz láser sobre animales de experimentación, Mester introdujo la terapia láser en el tratamiento de úlceras cutáneas de cicatrización retardada en personas.¹¹ Actualmente se le atribuyen más de 100 artículos propios, así como diversas colaboraciones con otros científicos, en especial con sus dos hijos.¹²

Durante las siguientes décadas el uso de la terapia láser se expandió por el resto de continentes. Así, por ejemplo, Yo-Cheng Zhou, cirujano maxilofacial chino, planteó en 1979 el uso del láser como terapia estimulante de puntos de acupuntura en el manejo del dolor en cirugías oro-maxilofaciales.¹³ Hoy en día, la estimulación con luz láser de puntos de acupuntura está más extendida y existen varios trabajos científicos publicados al respecto.^{14,15}

La principal limitación de este tipo de terapia en esas primeras décadas de expansión e introducción en la práctica clínica fue la baja potencia que alcanzaban los equipos, 50 mW máximos de potencia, y la escasez de estudios publicados. A medida que las tecnologías mejoraron, aumentaron las características y tipos de equipo láser. Esto permitió aumentar las posibilidades de uso y por consiguiente la obtención de resultados más consistentes, tanto científicos como clínicos

En 1981 apareció la primera asociación médica de terapia láser: *The American Society for Laser Medicine and Surgery* (ASLMS). En 1994, la *International Laser Therapy Association* (ILTA) y la *International Society for Laser Applications* (ISLAM) se fusionaron para formar la *World Association for Laser Therapy* (WALT). Estas dos (ASLMS y WALT) junto con la *North American Association for Photobiomodulation Therapy* (NAALT), creada en 1998, representan las tres mayores organizaciones en cuanto a terapia láser se refiere. Los principales objetivos de estas asociaciones son: dar a conocer los mecanismos fotobiológicos de la terapia láser, promover la investigación y la propia aplicación clínica.

En 2002 el primer láser Clase III B obtuvo la aprobación por parte de la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso en terapia médica. Los láseres Clase III B tenían una limitación de potencia de 500 mW por lo que su efecto terapéutico se centraba principalmente en tratamiento de lesiones superficiales. La FDA aprobó en 2006 los láseres terapéuticos de Clase IV, capaces de aplicar una potencia media de salida de al menos 500 mW. Los equipos de Clase IV que se emplean actualmente en terapia emiten generalmente entre 1 y 15 W de potencia media.

1.1.1. EVOLUCIÓN DE LA TERMINOLOGÍA

Históricamente, la Terapia Láser ha sido nombrada de multitud de formas: fotobioestimulación, terapia láser de bajo nivel, terapia de luz de bajo nivel, terapia láser de baja intensidad, terapia láser de baja potencia, fototerapia o láser frío entre otros. Todos estos términos pretendían diferenciar los equipos láser empleados en este tipo de terapia de aquellos utilizados en cirugía para la ablación, coagulación o el corte de tejidos.⁶ Así, por ejemplo, el término de láser frío hace referencia a la supuesta falta de efecto térmico sobre el tejido⁶, aunque es inexacto y ambiguo.

El primer término registrado oficialmente por la MeSH (*Medical Subject Headings*) fue el de “*Low Level Laser Therapy - LLLT*” o Terapia Láser de Bajo Nivel en castellano. LLLT fue empleado por primera vez en 1991 por el doctor escocés Glen Calderhead.¹⁶ A diferencia de otros términos que describían una cualidad del equipo láser, Calderhead utilizó el término “*Low Level*” para hacer referencia al efecto que la luz láser tenía sobre el tejido, siempre por debajo del nivel de daño tisular. A pesar de ello, el término LLLT contaba con más detractores que defensores. Esto, junto con la diversidad de equipos, prestaciones, efectos y terminologías, hizo necesario llegar a un consenso. Con este fin, en 2014 se organizó una asamblea que reunió a 15 participantes internacionales co-presididos por los Drs. Jan Bjordal y Juanita Anders. Se trató de una conferencia organizada de manera conjunta por la *North American Association for Photobiomodulation Therapy* (NAALT) y la *World Association for Laser Therapy* (WALT) en Virginia, Estados Unidos. De los distintos puntos tratados en la reunión los dos con mayor peso fueron:

- *Low Level Laser Therapy* – LLLT, en castellano “Terapia Láser de Bajo Nivel”, es el término aceptado por la MeSH (*Medical Subject Headings*) incluida dentro de la NLM (*National Library of Medicine*).
- Se reconoció el término *photobiomodulation* – PBM, en castellano “fotobiomodulación”, como el término más apropiado para este tipo de terapia, y se definió como: una forma de terapia que utiliza fuentes de luz no ionizantes, incluidos láser, diodos (LEDs), emisores de luz y/o luz de banda ancha, en el rango visible (400-700 nm) e infrarrojo cercano (NIR)

(700-1100 nm) del espectro electromagnético sobre lesiones para estimular la curación o el alivio del dolor.⁷

Finalmente, en el año 2016, la MeSH incluyó el término PBM en su registro. A día de hoy, los términos LLLT y PBM son empleados por muchos científicos, investigadores o clínicos con la misma apreciación semántica, aunque en realidad no expresen lo mismo. De esa manera, el término “Low Level Laser Therapy – LLLT”, comúnmente conocido en castellano como Terapia Láser – TL, hace referencia a un modelo de terapia que emplea luz láser con efectos de estimulación de tejidos y no de termoablación. Por su parte, el término fotobiomodulación, hace referencia a todos aquellos tipos de terapia que emplean luz (láser, LED, etc.) y que tienen un efecto estimulante sobre los mecanismos naturales de reparación del organismo. Es decir, la TL es una forma de PBM: la más eficaz.

1.2. QUÉ ES Y CÓMO FUNCIONA UN LÁSER

La palabra láser proviene del acrónimo inglés “*LASER*” (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) cuya traducción al castellano sería: amplificación de luz por emisión estimulada de radiación.¹⁷

La luz láser presenta tres propiedades:

- Luz monocromática. De un solo color, o lo que es igual, luz de una única longitud de onda, que depende del material que es estimulado.
- Luz coherente. Todos sus fotones están en fase. Al coincidir en una misma dirección de propagación, los estados vibracionales se suman. El resultado es un efecto de amplificación en la intensidad emitida.
- Luz direccionada. Gracias a la cavidad óptica, los fotones emitidos en el sentido de un eje del medio activo adquieren una marcada direccionalidad de emisión, es decir, se emiten de forma prácticamente paralela. Esto permite alcanzar grandes distancias con una mínima divergencia del haz.

Por lo tanto, un equipo láser produce un rayo de luz intenso, monocromático, colimado y coherente¹⁸, es decir, con todos los fotones en fase y en una misma dirección. La diferencia fundamental con los equipos LED es que estos últimos emiten una luz casi monocromática e incoherente en un proceso denominado electroluminiscencia.

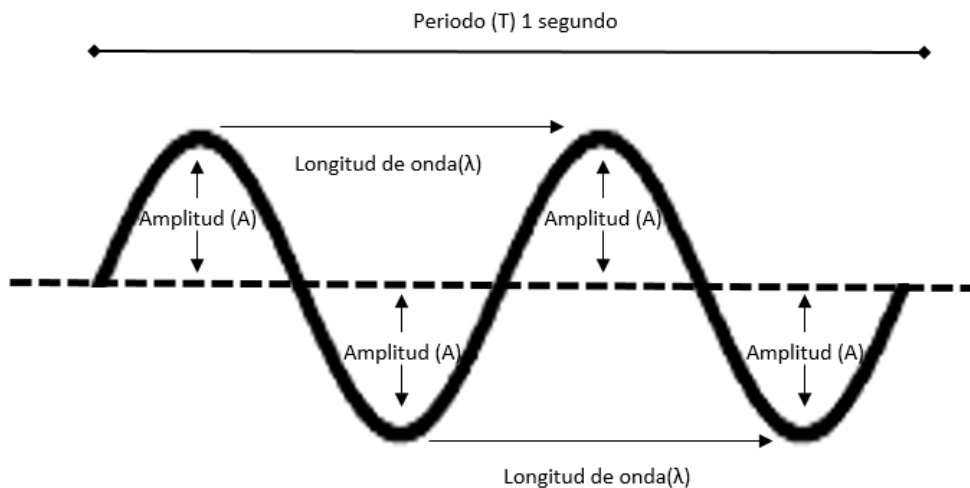
A diferencia de la luz láser, la luz LEDs tiene una escasa capacidad de penetración, por la dispersión (incoherencia) de la luz que emiten y su efecto fotobiomodulador se limita a tejidos muy superficiales.^{19,20} La terapia LED ha sido descrita como una terapia cómoda por su falta de efecto térmico sobre los tejidos.²¹ La FDA categoriza la luz LEDs como una terapia con riesgos no significativos²², lo que sugiere que su uso sea mucho más seguro que el de la luz láser. Sin embargo, en la mayoría de los estudios comparativos entre luz láser y luz LED, el uso de ambas en las mismas condiciones terapéuticas ofrece mayores ventajas con el uso de la luz láser.²³

1.2.1. PARÁMETROS FÍSICOS DE LA RADIACIÓN EMITIDA

La naturaleza de la luz ha sido interpretada a lo largo de los años de diversas maneras. Sir Isaac Newton (1643-1727), en su Teoría Corpuscular de 1670, decía que la luz estaba compuesta por corpúsculos que viajaban por el espacio en línea recta. Poco después, Christiaan Huygens (1629-1695) estableció la Teoría Ondulatoria (1678), donde hablaba de la luz como ondas similares a las del sonido y que requerían un medio para transportarse. En la Teoría Electromagnética de Maxwell (1831-1879), postulada en 1860, ya se habla de ondas electromagnéticas gracias al descubrimiento por parte del autor de similitudes entre la luz y las ondas de radio. Finalmente, fue el físico francés Louis-Victor de Broglie (1892-1987) quién en 1924 demostró la doble naturaleza de la luz a partir de la Teoría Electromagnética y la de los cuantos de Max Plank. Esa doble naturaleza hace referencia a la capacidad de la radiación electromagnética de producir campos eléctricos y magnéticos.

El láser es un tipo de luz, y como tal, se propaga como una onda electromagnética. Una onda es un conjunto de partículas que transportan energía en su propagación por un medio o espacio, y que presenta una serie de características que la definen, siendo las más relevantes (Figura 1):

Figura 1. Características de una onda electromagnética.

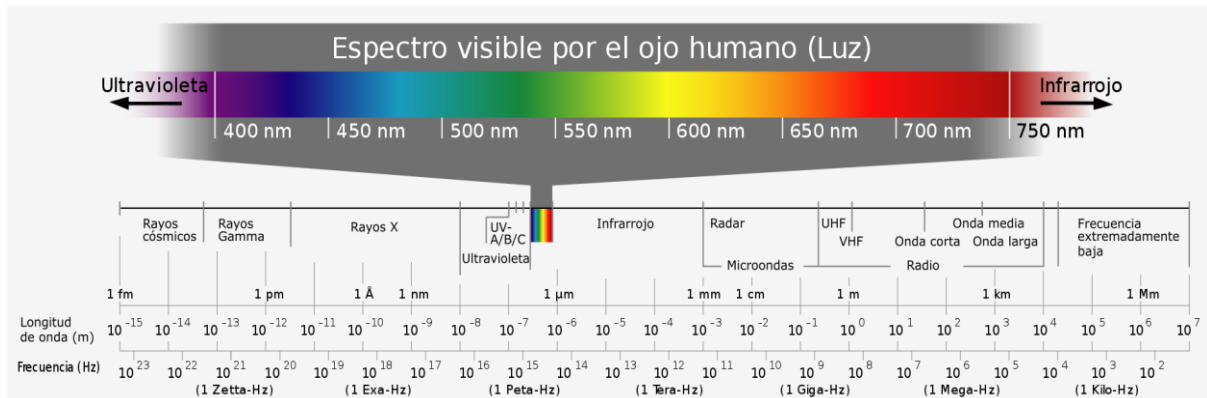


- Amplitud (A). Máxima altura que alcanza una onda. Informa sobre la cantidad de energía que transporta una onda. A mayor amplitud de onda mayor cantidad de energía.
- Longitud de onda (λ). Distancia entre dos puntos máximos de amplitud, lo que es igual, distancia de la onda en recorrer un ciclo completo.
- Frecuencia (f). Número de ondas que se irradian por unidad de tiempo. Es un valor inversamente proporcional a la λ : a mayor longitud de onda menor frecuencia. En la figura 1, se observan 2 ciclos en un segundo (2 Hz).
- Periodo (T). Tiempo que tarda la onda en realizar un ciclo completo.

Cuando las ondas electromagnéticas se organizan en un continuo de acuerdo a sus longitudes de onda se obtiene lo que se conoce como espectro electromagnético (EEM). Este espectro abarca desde grandes ondas de radio hasta pequeñas ondas de

rayos gamma. La luz visible para el ojo humano se encuentra entre la luz violeta (380-400 nm) y la luz roja (700-780 nm). Los láseres terapéuticos emiten luz a una longitud de onda entre la luz roja (650 nm) y la infrarroja cercana (NIR) (1100 nm), a este intervalo de longitud de ondas lo denominaremos como ventana terapéutica (Figura 2).

Figura 2. Espectro electromagnético (EEM).



Fuente: Wikipedia, autor anónimo.

1.2.2. CÓMO EMITE LUZ UN ÁTOMO

Un átomo está formado por un núcleo, compuesto de uno o más protones y generalmente un número similar de neutrones. Alrededor del núcleo se disponen electrones, uno o más. A mayor energía por parte del electrón, más lejos se sitúa del núcleo.

Los átomos emiten luz en tres pasos:

- El átomo parte de su estado fundamental.
- Al absorber energía, uno o más electrones son expulsados del núcleo, lejos de él. En este punto, el átomo se encuentra “excitado”.
- Un átomo excitado es un material inestable que para volver a su estabilidad libera energía en forma de fotones (luz).

De esta manera, un láser es un equipo donde millones de átomos mantienen la estabilidad liberando billones de fotones a la vez que se alinean para formar un haz de

luz concentrado. Hay que tener presente que, para obtener un proceso de emisión de luz es necesario alcanzar lo que se conoce como “inversión de población”, es decir, que el número de electrones en el nivel energético de excitación sea mayor que en el nivel de energía estable.

La energía emitida sobre el medio activo provoca que los átomos de este medio se estimulen al absorber esa energía en un proceso denominado absorción. Los átomos excitados recuperan su estado fundamental mediante la eliminación de fotones de luz en lo que se conoce como emisión espontánea. Este proceso se genera en los dispositivos LEDs y la luz que genera es incoherente. Por el contrario, en aquellos casos en los que un fotón estimule un átomo en su estado de excitación, este átomo vuelve a su estado fundamental liberando tanto el fotón de la excitación como el fotón original, amplificando de esta manera la luz emitida, siendo una luz coherente. Este fenómeno, descrito por Einstein en 1916, se denomina emisión estimulada.

1.2.3. COMPONENTES DE UN EQUIPO LÁSER

Cualquier láser tiene tres elementos fundamentales: un medio activo, una cavidad resonante y un sistema de bombeo.

- Medio activo. Es el material que emite la luz. Desde la construcción del primer láser de rubí, en 1960 por Theodore Maiman, se han desarrollado numerosos sistemas láser utilizando medios sólidos, líquidos, gaseosos y semiconductores. El material que constituye el medio activo es, en definitiva, el elemento que determina la longitud de onda de la emisión, además de dar nombre al láser.
 - Medio activo sólido. Material no conductor de cristal o vidrio. Genera una emisión monocromática con una longitud de onda que viene dada por las características de la lámpara que empleamos en el sistema de bombeo. Entre los ejemplos más utilizados cabe destacar el láser de rubí ($\lambda=694,3$ nm) y el láser Nd:YAG ($\lambda= 1064$ nm).
 - Medio activo líquido. Permiten modificar la longitud de onda del haz emitido pudiendo llegar a emitir tanto en ultravioleta (UV), como en luz visible, así

como en infrarrojo (IR). Para crear el medio líquido se emplea un colorante orgánico como la Rodamina 6G y un solvente líquido como el alcohol metílico.

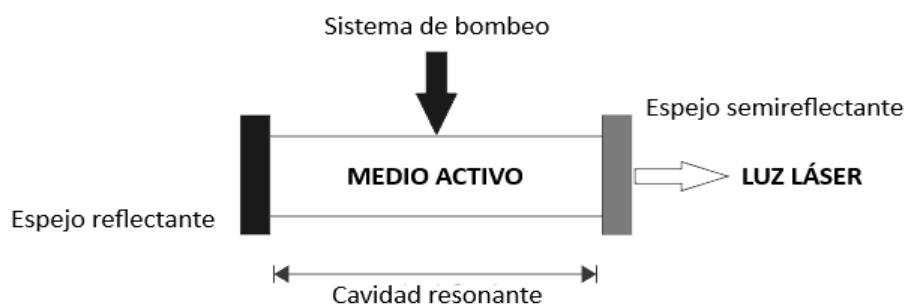
- Medio activo gaseoso. Compuesto por uno o más gases y cuya excitación depende del flujo eléctrico generado por una fuente de alta tensión. El principal láser terapéutico de medio gaseoso es el láser He-Ne (Helio y Neón), el cual emite con una longitud de onda de 632 nm. Aunque, el láser de medio activo gaseoso más versátil es el láser de CO₂. Este láser emite a una longitud de onda de 10.600 nm y se emplea tanto en medicina (principalmente cirugía) como en industrias del corte y la soldadura, entre otros.
- Medio activo semiconductor. Compuesto por dos capas, una tipo *p* (con huecos para recibir electrones) y otra tipo *n* (encargada del suministro de electrones). La unión de ambas capas da lugar a la transmisión de electrones de una a la otra generando así una gran cantidad de energía. El principal láser de medio semiconductor es el diodo láser Ga-As (Galio y Arsenio) que emite a una longitud de onda entre los 630 y 900 nm. Los láseres que contienen este medio son los conocidos como láser de diodo.
- Sistema de bombeo. Encargado de aportar energía externa para favorecer la estimulación del medio activo y así emitir la luz. Existen diversos sistemas de bombeo:
 - Bombeo óptico. Emplea una fuente luminosa y generalmente son los empleados en aquellos láseres cuyo medio activo es un material sólido (ej. láser de rubí).
 - Bombeo eléctrico. Emplea una corriente eléctrica que transmite a través del medio activo, generalmente un material gaseoso (ej. láser He-Ne) o semiconductor (ej. láser As-Ga).
 - Bombeo químico. Basado en la energía liberada en la creación y destrucción de enlaces químicos (ej. láser flúor-hidrógeno).

Los sistemas de bombeo darán lugar a dos tipos de emisión diferente:

- Emisión continua (CW). Los pulsos emitidos por el dispositivo son tan continuos que es imposible diferenciar uno del otro. La potencia de emisión de este tipo de emisión es constante en el tiempo.
 - Emisión pulsada. Algunos dispositivos tienen la capacidad de emitir pulsos fácilmente diferenciables y la energía transmitida viene dada por la suma de la energía transmitida por cada uno de los pulsos, la frecuencia con la que se repiten y el ancho y duración de cada pulso.
- Cavity resonante. Formada por dos espejos a ambos lados del medio activo, que favorecen que los fotones reboten de un lado para el otro y a su paso por el medio activo estimulen la emisión de más radiación. Uno de los espejos es semi reflectante por lo que facilita la salida de la luz amplificada en forma de haz, muy concentrado y con escasa divergencia.

Los láseres empleados en terapias médicas suelen presentar un medio activo semiconductor y un sistema de bombeo eléctrico. (Figura 3)

Figura 3. Componentes de un equipo láser.



1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS EQUIPOS LÁSER

La clasificación láser, también denominada Categorías de Peligrosidad, se basa en el Límite de Emisión Accesible (LEA) (ver sección 1.3.1) para el usuario. Las dos organizaciones internacionales encargadas de esta clasificación son la *American National Standards Institute* (ANSI) y la *International Electrotechnical Institute* (IES). En

España la última norma que recoge esta clasificación es la UNE EN 60825-1/A2, actualizada en el año 2015 y donde se reflejan 8 grupos:

- Clase I. Productos láser que son seguros en todas las condiciones de utilización razonablemente previsibles, incluyendo el uso de instrumentos ópticos en visión directa.
- Clase I M. Láseres que emitiendo en el intervalo de longitudes de onda entre 302,5 y 4000 nm son seguros en condiciones de utilización razonablemente previsibles, pero que pueden ser peligrosos si se emplean instrumentos ópticos para visión directa como lupas o binoculares.
- Clase I C. Láseres diseñados específicamente para ser utilizados en contacto directo con la piel o tejidos no oculares. Es necesario el empleo de equipos de protección ocular y su LEA debe ser inferior al LEA permitido para los láseres Clase I cuando cese el contacto entre el láser y el tejido.
- Clase II. Láseres que emiten radiación visible en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 400 y 700 nm. La protección ocular se consigue normalmente por las respuestas de aversión, incluido el reflejo palpebral. Esta reacción puede proporcionar la adecuada protección, aunque se usen instrumentos ópticos.
- Clase II M. Láseres que emiten radiación visible (400 y 700 nm). La protección ocular se consigue normalmente por las respuestas de aversión, incluido el reflejo palpebral, pero la visión del haz puede ser peligrosa si se usan instrumentos ópticos como lupas o binoculares.
- Clase III R. Láseres que emiten entre 106 y 302,5 nm, cuya visión directa del haz es potencialmente peligrosa pero su riesgo es menor que para los láseres de Clase III B. Necesitan menos requisitos de fabricación y medidas de control del usuario que los aplicables a láseres de Clase III B. El límite de emisión accesible es menor que 5 veces el LEA de la Clase II en el rango de 400-700 nm, y 5 veces el LEA de la Clase I para las otras longitudes de onda.

La mayoría de los punteros láser pertenecen a este grupo.

- Clase III B. Láseres cuya visión directa del haz es siempre peligrosa (ej. dentro de la Distancia Nominal del Riesgo Ocular – ver sección 1.3.1). La visión de reflexiones difusas es normalmente segura.

Tienen una potencia de salida de hasta 500 mW y un rango de longitud de onda comprendido entre los 300 nm hasta la luz infrarroja. Los láseres terapéuticos con una potencia entre los 5 y 500 mW pertenecen a esta clase.

- Clase IV. Láseres que también pueden producir reflexiones difusas peligrosas. Pueden causar daños sobre la piel y pueden también constituir un peligro de incendio si son utilizados de forma incorrecta. Su utilización precisa extrema precaución.

En este grupo incluiríamos desde láseres terapéuticos con una potencia comprendida entre los 0,5 y 20 W, hasta equipos de cirugía, soldadura o de la industria aeroespacial. Los riesgos de los equipos de terapia láser no son comparables a los riesgos de cualquier otro equipo de potencias muy superiores.

1.3.1. PELIGROSIDAD Y MEDIDAS DE PRECAUCIÓN

Los parámetros de cada equipo láser están recogidos en la normativa de la clasificación por categorías de peligrosidad. El Límite de Emisión Accesible (LEA) es el parámetro que determina la cantidad máxima de irradiación a los que la piel y los ojos pueden estar expuestos.²⁴ El LEA depende de la longitud de onda, tiempo de exposición y modo de entrega de la terapia láser.

- Ojos. El principal peligro de la terapia láser en los ojos radica en el daño que puede ocasionar a la retina. La luz visible e infrarroja cercana atraviesa la córnea y el cristalino incidiendo directamente sobre la retina. El cristalino actúa a modo de lente pudiendo amplificar la luz 100.000 veces y variando su dirección.

Su efecto puede provocar desde pérdidas parciales de la visión hasta ceguera completa. Todos los parámetros asociados a la TL repercuten en el efecto directo de la luz sobre la retina. Los equipos láser desde la Clase I hasta la Clase III R deben utilizarse con precaución, evitando que la luz incida directamente sobre

el ojo. Los láseres Clase III B y IV pueden dañar la visión incluso por radiaciones indirectas, por lo que el uso de gafas protectoras es obligatorio. Actualmente, todas las casas comerciales facilitan gafas apropiadas para las terapias de sus equipos. La protección de los ojos de los pacientes es igual de importante que la del clínico, por lo que en medicina veterinaria existen gafas especiales que se adaptan a la cabeza de los animales domésticos.

La distancia nominal de riesgo ocular (DNRO), es la distancia a la cual la exposición a la radiación es igual al LEA para la retina. Esta distancia se emplea para delimitar las zonas de radiación láser. Su cálculo varía en función del tipo de exposición. Para láseres terapéuticos Clase IV como los de este estudio, la DNRO es de 6,5 metros aproximados de distancia.

- Piel. Radiaciones de luz ultra-violeta pueden provocar eritema o ampollas en la piel. Un ejemplo claro del efecto de la luz ultra-violeta sobre la piel es la propia luz solar. Los rayos de luz solar están directamente implicados en la carcinogénesis cutánea.

La luz infrarroja empleada en TL es sin embargo no ionizante (no mutagénica), pero también presenta efectos directos sobre la piel, desde vasodilatación o estímulo del metabolismo celular cuando se trabaja a temperaturas fisiológicas como en TL, a ablación y corte, como cuando se emplea con fines quirúrgicos.

Aquellas salas destinadas al empleo de la TL, principalmente en terapias con láseres Clase III B y IV, deberán tener bloqueada la salida de luz y estar señalizadas tanto en puertas como ventanas para evitar la exposición accidental de personas no equipadas con gafas de protección.

1.4. PARÁMETROS DE TRATAMIENTO

Ante la falta de consenso acerca de los parámetros de tratamiento empleados para según qué tipo de terapia, paciente, patología, etc., la *World Association for Laser Therapy* (WALT) publicó en 2010 una guía de los parámetros sugeridos en determinados tratamientos.²⁵ Estos parámetros fueron reevaluados cuatro años después en el

consenso internacional organizado por la WALT y la NALT en EE.UU., sin que se llevara a cabo ningún cambio al respecto.

A continuación, se describen algunos de los parámetros que deben ser especificados para cada estudio clínico con TL según el consenso aprobado en 2004 por la *World Association of Laser Therapy*²⁶, así como una breve descripción de los mismos.

- Longitud de onda (nm). Distancia entre dos puntos de máxima amplitud de una onda electromagnética. La longitud de onda de un láser determinará la capacidad de penetración. Su unidad de medida son los nanómetros (nm). La longitud de onda de las luces comprendidas dentro de la ventana terapéutica abarca aproximadamente entre los 650 y los 1100 nm.
- Dosis (J/cm^2), también denominada densidad de energía o fluencia. Determina la cantidad de energía entregada a un área determinada. Su unidad de medida son los julios por centímetros cuadrados (J/cm^2). Las dosis más habituales en el tratamiento de alteraciones superficiales con un láser Clase IV varía entre 1 y 5 J/cm^2 , aunque se han descrito resultados con dosis más altas, como se verá más adelante.
- Energía total entregada (J). Determina la cantidad de energía total entregada en una sesión de terapia láser. Su unidad de medida es el julio (J). Es el resultado de multiplicar el tiempo de tratamiento por la potencia media empleada.
- Densidad de potencia (W/cm^2). Determina la cantidad de fotones que alcanzan una determinada área por unidad de tiempo. Su unidad de medida es el vatio por centímetro cuadrado (W/cm^2). Un W equivale a un julio por segundo ($W = J/s$).
- Potencia media (P_a): mientras que en los tratamientos con emisión continua (CW) no hay variación en la potencia, cuando la luz es pulsada la P_a viene determinada por la potencia pico (P_p) multiplicada por el ciclo de trabajo, que a su vez es el producto de la frecuencia de pulsado (Hz) por la duración de los pulsos.

- Tiempo (s). Determina la cantidad de tiempo que se emplea en una sesión de terapia láser. Se mide en segundos (s).
- Frecuencia de pulsado (Hz). La gran mayoría de los equipos láser emiten luz de manera continua (CW). Otros equipos, tienen la capacidad de bloquear la salida de luz provocando una emisión pulsada. En estos casos, la unidad de medida que determina la frecuencia de pulsado por segundo se expresa en Hercios (Hz).
- Área del haz de luz (cm²). Determina el área de superficie que la luz irradia en estático. Su unidad de medida es el centímetro cuadrado (cm²). Esta área, dependerá del zoom de la pieza de mano del equipo, así como la distancia entre la superficie y dicha pieza.
- Método de aplicación. Existen dos variaciones para dos tipos distintos de aplicación de la TL. En primer lugar, en función de la distancia de la pieza de mano con la superficie tendremos una aplicación por contacto o no contacto. Y, en segundo lugar, según la manera de desplazamiento sobre la superficie tendremos una aplicación por escaneo o por puntos.
- Frecuencia de sesiones. El número de sesiones totales para tratar una patología concreta, así como la distribución de ellas en el tiempo, variará para cada caso particular. Por ejemplo, en el tratamiento de patologías musculoesqueléticas crónicas se aconseja realizar una sesión de TL cada 2-3 semanas en la fase de mantenimiento.²⁷

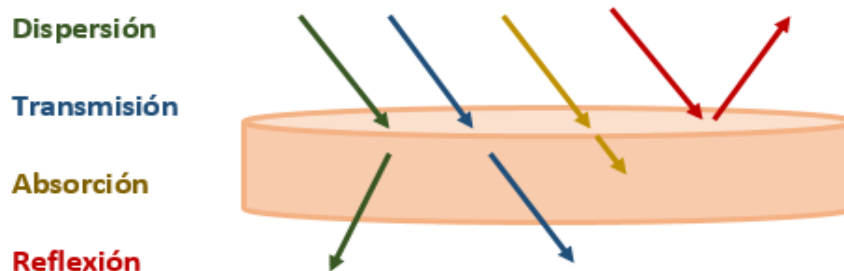
1.5. INTERACCIÓN DE LA LUZ CON EL PACIENTE A NIVEL MOLECULAR Y CELULAR

1.5.1. ABSORCIÓN VS DISPERSIÓN

La capacidad de penetración por parte de la luz dependerá en primer lugar de la longitud de onda. A mayor longitud de onda mayor capacidad de penetración en el tejido. La luz que no es reflejada por el tejido irradiado puede ser transmitida (siguiendo su camino en la misma dirección), dispersada (continúa penetrando, pero hay un cambio en la dirección) o absorbida (Figura 4). Si la energía que tiene un fotón no es igual a la

diferencia de energías entre los niveles de la molécula irradiada, el fotón será dispersado. El fenómeno más habitual de los fotones en el tejido es la dispersión. Esta se caracteriza por cambios direccionales, pero no de energía por parte de la luz. De esta manera, un fotón se dispersará en el tejido con toda su energía hasta su completa absorción.

Figura 4. Fenómenos de dispersión, transmisión, absorción y reflexión de un fotón de luz.



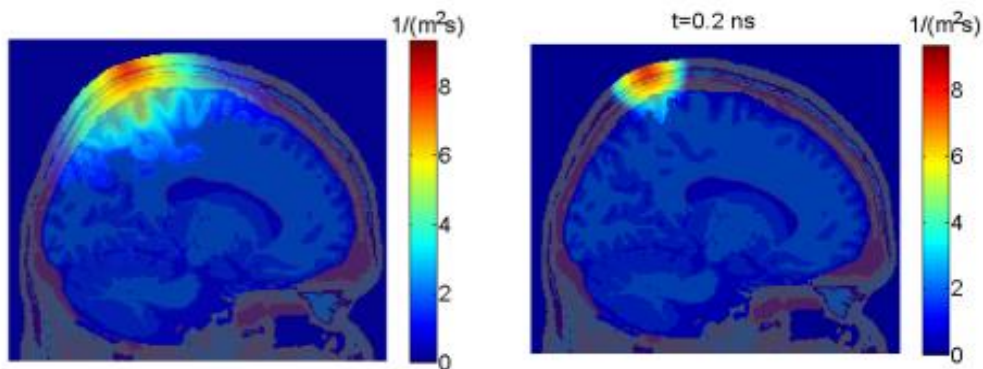
Uno de las características que define la interacción de la luz incidente con el tejido irradiado es el factor de anisotropía (g) de cada tejido en cuestión. Tiene unos valores absolutos que varían entre -1 y 1, donde 1 implica que la luz que sale de un material lleva la misma dirección que la luz que penetró en él, -1 implica una reflexión completa y 0 una reflexión de 90° . El tejido vivo presenta un g que puede variar entre 0,8 y 0,99.

Al penetrar en el tejido, la luz comienza a ser atenuada por la absorción y dispersión de sus fotones. Estos fenómenos se caracterizan por unos coeficientes que, junto con el factor de anisotropía, determinan cómo es la interacción de la luz con el tejido y hasta qué profundidad llega qué densidad de fotones.

Los modelos de Montecarlo son un método predictivo, empleado en climatología, telecomunicación, geoestadística, biología computacional o video juegos entre otros, además de en el estudio de la interacción de los fotones de luz con el tejido.²⁸ Se trata de un método estadístico que emplea algoritmos para simular procesos caóticos como puede ser la interacción de la luz en un medio, calculando el movimiento,

absorción, dispersión y reflexión de los fotones en un tejido determinado, cuyas características ópticas se han incluido en la base de datos del sistema empleado. Una vez obtenidos los resultados, el programa representa un gráfico donde se puede comprobar la absorción de dichos fotones en el tejido (Figura 5). Esto ayuda a predecir la interacción de la luz láser de una terapia determinada con el tejido diana, y la profundidad de penetración de la luz, y de esa manera optimizar los parámetros de terapia.

Figura 5. Gráfico de Montecarlo para la representación de la migración de fotones de luz sobre tejido vivo humano entre una frecuencia continua (izquierda) y pulsada (derecha).



Fuente: Fang y cols, 2009.²⁹

1.5.2. CROMÓFOROS - EFECTOS MOLECULARES Y CELULARES

La primera ley de la fotoquímica (Grotthus y Draper, 1818) dice que sólo la radiación absorbida puede promover cambios fotoquímicos. El estado básico y fundamental de una molécula es alterado por la absorción de la energía de los fotones que inciden sobre dicha molécula. Cada molécula es capaz de absorber energía en una franja de radiación más o menos larga pero siempre limitada, que se llama espectro de absorción de la sustancia en cuestión.³⁰

Las moléculas, o parte de ellas, capaces de absorber energía a partir de una radiación luminosa se denominan cromóforos. Los cromóforos se dividen en dos grupos: foto-aceptores y foto-receptores. Los foto-receptores son moléculas especializadas en la absorción de luz y su función dependerá de eso (Ej. la clorofila en la célula vegetal).

Los foto-aceptores son moléculas que no están especializadas en la absorción de luz, pero sí presentan capacidad de absorberla. Dicha absorción de luz puede ayudar al desarrollo de su función. Dentro del organismo hay una serie de cromóforos intra- y extracelulares, la mayoría foto-aceptores, capaces de cambiar su estado fundamental al recibir una radiación determinada desencadenando efectos biológicos a nivel celular mediante reacciones bioquímicas.³¹

El cromóforo más abundante del organismo es la molécula de agua, ya que compone en torno al 80% de la materia de todas las células. Las células además presentan otras moléculas de mayor peso que actúan como agentes de contraste del agua. Estos elementos actúan como blancos de la radiación, siendo los más representativos el hierro y el cobre. La mayor concentración de estos dos elementos en el organismo se encuentra en la hemoglobina y la citocromo-c-oxidasa (CCO) respectivamente. Otro cromóforo que observamos en gran cantidad es la melanina, que junto con el agua, hemoglobina y citocromo-c-oxidasa representan los cuatro foto-aceptores más importantes del organismo.

- Agua. La molécula de agua está formada por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno unidos mediante un enlace covalente. Como se ha comentado anteriormente, el agua supone en torno al 80% del volumen de las células. En TL su espectro de absorción oscila entre los 700 y 1100 nm, encontrándose el pico de absorción en torno a los 970 nm. Su principal efecto biológico radica en la fluctuación térmica que origina en los tejidos, que a su vez estimula la circulación.
- Melanina. Engloba un grupo de pigmentos naturales del organismo que dotan de color a la piel y el pelo. Hay dos tipos principales de melaninas, ambos derivados del aminoácido tirosina:
 - Eumelanina. Forma más común de la melanina. Dota de color negro o marrón por su alto contenido en azufre.
 - Feomelanina. Dota de color amarillo o rojizo por presentar menor cantidad de azufre.

En TL el espectro de absorción oscila entre los 650 y 900 nm siendo su pico de absorción cercano a los 660 nm, además de absorber la luz visible. Por su localización, la radiación a una longitud de onda comprendida dentro su espectro de absorción tiende a ser atenuada en capas superficiales de la epidermis. Más que ser una diana de la TL, representa una barrera para la penetración de la luz hasta capas más profundas, absorbiendo gran parte de la energía en la superficie del paciente.

- Hemoglobina. Proteína del interior de los glóbulos rojos que le dota del color rojo característico. Formada por cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) y cuatro grupos hemo, uno por cadena. Cada grupo hemo está compuesto por cuatro subunidades pirrónicas que forman un anillo. En el interior de dicho anillo se encuentra un átomo de hierro que se une de manera reversible a una molécula de oxígeno. Su principal función en el organismo es la de transportar el oxígeno de los pulmones a los tejidos, en forma de oxihemoglobina, y el dióxido de carbono de los tejidos a los pulmones, en forma de desoxihemoglobina. Su espectro de absorción dentro de la ventana terapéutica oscila entre los 750 y los 1100 nm, teniendo el pico de absorción cercano a los 905 nm. A nivel terapéutico, la estimulación de la oxihemoglobina promueve la liberación del oxígeno en los tejidos y por consiguiente de la captación del CO₂ tisular por el grupo hemo.³²
- Citocromo-c-oxidasa (complejo IV) – CCO. Proteína que se encuentra incluida dentro de la bicapa lipídica de las mitocondrias y bacterias. Está formada por varias subunidades proteicas que contiene los grupos prostéticos que intervienen en el transporte de electrones: dos grupos hemo (citocromo a y a₃) y 2 núcleos que contienen iones Cu²⁺ (centros Cu_A y Cu_B). Participa en la cadena de transporte de electrones, recibiendo un electrón de cada una de las cuatro moléculas de citocromo c (Complejo III) que posteriormente transfiere a una molécula de oxígeno, reduciéndola a dos moléculas de agua. En este proceso se produce una translocación de protones a través de la membrana, lo cual genera un gradiente electroquímico que la enzima ATP sintasa emplea para sintetizar adenosín trifosfato (ATP). Su espectro de absorción abarca desde los 650 a los

900 nm en TL, y su pico de absorción aproximado se encuentra cerca de los 800 nm. El efecto biológico secundario a su estimulación supone el aumento del metabolismo celular.³³ Es el cromóforo con mayor relevancia terapéutica de la PBM.

Tras las reacciones moleculares que se desencadenan por la acción directa de la luz sobre los cromóforos se producen una serie de cambios celulares. Estos cambios pueden aparecer en horas o días después de la irradiación y son denominados por algunos autores como reacciones secundarias.³³ La respuesta celular a la PBM se ha determinado utilizando tanto ensayos *in-vitro* como *in-vivo*. Los estudios *in-vitro* han demostrado resultados en una gran variedad de tipos celulares como fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, linfocitos o células musculares.^{34,35} A nivel celular podríamos diferenciar tres tipos distintos de efectos.

- Efecto fototérmico. Reacción que se origina tras la absorción de luz por parte de una partícula y que desencadena la liberación de energía en forma de calor. En la TL el principal efecto foto-térmico radica en el efecto directo de la luz sobre el agua. Como se comentó anteriormente, las fluctuaciones térmicas de los tejidos secundarias a la absorción de la luz láser por parte del agua provocan un estímulo de la circulación sanguínea. El aumento de la temperatura por encima del valor fisiológico es un efecto a evitar en TL.
- Efecto fotoeléctrico. Reacción que se origina tras la absorción de luz por parte de una partícula y que desencadena un flujo de electrones en el interior de esa misma partícula. Un ejemplo sería la estimulación de la mitocondria con luz láser. La radiación directa del orgánulo desencadena un aumento del flujo de electrones en la cadena transportadora de electrones (CTE) que a su vez provoca una mayor síntesis de ATP.
- Efecto fotoquímico. Reacción que se origina tras la absorción de luz por parte de una partícula y que desencadena una serie de reacciones químicas en la que esa partícula experimenta un cambio. Es el efecto más importante y necesario para obtener resultados beneficiosos con la terapia láser.

- La primera ley de la fotoquímica (Ley de Grotthus-Draper), establece que la luz debe ser absorbida para que produzca la reacción.
- La segunda ley de la fotoquímica (Ley de Stark-Einstein), establece que por cada fotón absorbido por un sistema químico una sola molécula es activada para dar lugar a una reacción.

En definitiva, el efecto de la radiación sobre las células depende de la absorción de energía y la consiguiente transformación en procesos biológicos.³⁶

Aunque algunos mecanismos de acción no son del todo conocidos, investigaciones llevadas a cabo en los últimos años permiten llegar a un consenso general donde la mitocondria parece ser el elemento más sensible de la célula a la radiación con luz roja e infrarroja cercana.³⁷

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana cuya principal función es la de generar energía en forma de ATP. La cadena transportadora de electrones (CTE), localizada en la membrana interna de la mitocondria, es la principal fuente de síntesis de ATP. Dicha cadena está formada por cuatro complejos enzimáticos primarios denominados I, II, III y IV y varios secundarios. Estos complejos primarios están encargados de crear un gradiente electroquímico que se utiliza para la síntesis de ATP en lo que se conoce como fosforilación oxidativa. La radiación sobre estas moléculas desencadena la intensificación en la transferencia de electrones disponibles para los complejos y por consiguiente un aumento de la fosforilación oxidativa.³⁸ De esta manera se favorece la producción de ATP³⁹, síntesis de ADN y ARN⁴⁰, modulación de especies de oxígeno reactivas (ROS)⁴¹ y especies de óxido nítrico (NO)⁴², e induce factores de transcripción.³⁴ En definitiva, la estimulación mitocondrial por parte de la TL desencadena un aumento del metabolismo celular.⁴³

El complejo IV, o complejo terminal de la cadena transportadora de electrones, se denomina citocromo-c-oxidasa (CCO). La CCO actúa como el principal foto-aceptor para la luz roja e infrarroja cercana de la mitocondria.⁴⁴

La producción de NO en la célula dañada provoca que la CCO bloquee la cadena respiratoria celular al producirse el desplazamiento de las moléculas de oxígeno.⁴⁵ La TL parece desbloquear la unión entre la CCO y el NO.⁴⁶

El aumento en la síntesis de ATP, ROS, NO y Ca^{2+} favorece los efectos bioquímicos intracelulares que desencadenarán los efectos a nivel celular.

- ATP (Adenosín trifosfato). El ATP es un nucleótido que participa en multitud de roles esenciales dentro de las células. Se trata de la principal fuente de energía de los mecanismos celulares. Pasarrella y cols. demostraron que la radiación de mitocondrias aisladas del hígado de ratas producía un aumento de la síntesis de ATP.⁴⁷ Otros autores también han demostrado que el ATP no solo es una fuente de energía, sino que también se trata de una molécula que participa en las señales intercelulares.^{38,48}
- NO (Óxido nítrico). La respiración mitocondrial está inhibida por el NO. El NO es un radical libre gaseoso que se encuentra tanto intra- como extracelular. Cuando se encuentra fuera de la célula participa en la circulación gracias a su potente capacidad de vasodilatación y además actúa como un neurotransmisor esencial. Dentro de la mitocondria se une a uno de los grupos prostéticos de la CCO provocando el desplazamiento del oxígeno. La irradiación parece disociar dicha unión favoreciendo de nuevo la llegada del oxígeno a la cadena respiratoria y reanudando la respiración a la vez que genera especies reactivas de oxígeno (ROS).³⁴
- ROS (Especies reactivas de oxígeno). Son pequeñas moléculas que incluyen un ion de oxígeno como el superóxido, o radicales libres como el peróxido de hidrógeno o el peróxido orgánico entre otras.⁴⁹ Las ROS tienen un papel fundamental en las vías de señalización celular, su aumento puede desencadenar la alteración de la actividad redox.⁴⁹ Huang y cols. definen el estrés oxidativo como el desajuste celular entre la producción de ROS y la capacidad de eliminarlos.⁵⁰ Y aunque la TL favorece la producción de ROS, también se ha comprobado que la TL tiene un efecto antioxidante.⁵¹⁻⁵³ El efecto antioxidante en células dañadas por parte de la TL parece ser mayor que en células sanas.⁵⁴
Su presencia en las células puede causar efectos tóxicos mediante la producción de radicales libres y el daño de diferentes componentes celulares como la peroxidación lipídica, rotura de la cadena de ADN y fragmentación proteica. El

aumento de ROS en las células desencadena un estrés oxidativo, resultando en la activación de factores de transcripción como son NF- κ B⁴¹, AP-1, HSP y JNK.⁵⁵ Por otro lado, el aumento de las ROS forma parte del estallido respiratorio de células del sistema inmune, capaces de aumentar la demanda de oxígeno y producir productos con capacidad microbicida como el hipoclorito (HOCl), hipobromito (HOBr) o hipoyodito (HOI) entre otros.⁵⁶

Existen sensores moleculares situados sobre las células que detectan ROS cuando son oxidados. Estas nuevas estructuras desencadenan la transducción de señales que origina una cascada de reacciones con el objetivo de mantener la homeostasis celular. Esto está regulado por factores de transcripción.⁵⁷ Por ejemplo, AP-1 (proteína activadora 1) regula la expresión genética en respuesta a estímulos como el estrés oxidativo, factores de crecimiento, citoquinas o infecciones víricas o bacterianas. NF- κ B, por su parte, tiene un papel fundamental en la inflamación, estrés oxidativo, apoptosis y estrés inmunitario. Al igual que ocurre con la AP-1, NF- κ B se estimula en respuesta al estrés oxidativo, inflamación y daño.⁴¹

Las porfirinas también parecen generar ROS tras la terapia láser.⁵⁸ El láser de diodo también ha sido empleado para producir ROS en células hematopoyéticas.⁵⁹ Al estimular fibroblastos con fotones también se observó un aumento de ROS.^{60,61} Por último, se ha comprobado que la simple estimulación de fibroblastos con luz solar desencadena un aumento de los ROS.⁶⁰

Las especies reactivas de oxígeno parecen ser el principal foco de interés en estudios experimentales con terapia láser de otros muchos autores.⁶²⁻⁶⁴

- Ca²⁺. Otra función de la mitocondria es la síntesis, almacenaje y liberación de calcio celular (Ca²⁺). El calcio celular es responsable de varias funciones, pero principalmente de la transducción de señales. Karu y cols. observaron que las concentraciones de Ca²⁺ intracelular aumentan después de la radiación con un láser de He-Ne en linfocitos humanos.³⁷ Lubart y cols. realizaron un ensayo donde comprobaron que a baja potencia la PBM podía influir en el transporte de Ca²⁺ a través de la membrana mitocondrial.⁶⁵ De igual modo, observaron

diferencias en la absorción de Ca^{2+} por parte de la mitocondria según la longitud de onda empleada. De esa manera, demostraron la importancia de la dosimetría para obtener unos resultados favorables.

1.6. APLICACIONES DE LA TERAPIA LÁSER: EFECTOS FISIOLÓGICOS EN EL PACIENTE.

Los mecanismos de acción de la TL representan uno de los campos de investigación más importante dentro de la foto-medicina. Desde la creación del primer láser en la década de 1960, muchos científicos e investigadores han buscado nuevos efectos terapéuticos de la TL, así como los mecanismos del desarrollo de los mismos.

Existen más de 5900 artículos que aparecen bajo las siglas LLLT en uno de los principales buscadores de literatura científica como es PubMed. Los ensayos *in-vivo* e *in-vitro* son el paso previo a los estudios clínicos, pero no permiten hacer una extrapolación directa de los resultados, por su propia naturaleza experimental y por la amplia cantidad de parámetros de terapia posibles, así como el gran número de patologías en estudio. Por todo ello, a día de hoy siguen existiendo controversias sobre los efectos beneficiosos de la TL.

Para cada tipo de terapia los parámetros deben ajustarse con el fin de conseguir la mayor efectividad posible del tratamiento. En aquellos casos que la radiación sea insuficiente no conseguiremos un efecto terapéutico. Por otro lado, radiaciones por encima de lo necesario provocarán un efecto de inhibición por parte del tratamiento. Esto se conoce como el principio de *Arndt-Schulz*. Esta ley enuncia que las pequeñas excitaciones provocan sobre una célula un aumento o disminución de sus funciones fisiológicas en relación con la intensidad de dicha excitación, tratándose de una relación inversamente proporcional. En TL, no está demostrado que esta ley se pueda aplicar a la dosis empleada, pero sí a la densidad de potencia, donde un aumento de esta podrá determinar un efecto foto-térmico sobre el tejido, totalmente indeseado en PBM.

Los tres principales efectos terapéuticos estudiados de la PBM secundarios a la estimulación celular son: la regeneración tisular, la reducción de la inflamación y el alivio del dolor.

1.6.1. REGENERACIÓN TISULAR – CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

Muchos autores han descrito el efecto estimulador de la TL sobre diferentes tipos celulares. Existen efectos primarios de la luz láser sobre los cromóforos intra- y extracelulares, y otros derivados de la amplificación de estos. Anteriormente se ha comentado la estimulación del metabolismo celular como resultado de la absorción de energía por parte de las células, siendo en la mitocondria el primer lugar donde se produce este efecto.

La angiogénesis, microcirculación o el aporte de oxígeno al tejido afectado, provoca que los procesos asociados a la reparación tisular se desencadenen con mayor rapidez en comparación a cómo lo harían de manera fisiológica.⁶⁶

Pinheiro y cols. observaron que con la aplicación de luz infrarroja sobre perforaciones en fémures de ratas se favorecía la osificación del daño originado en comparación con los pacientes del grupo control.⁶⁷ Este aumento del tejido óseo cicatricial también fue observado anteriormente en otro modelo experimental sobre esa misma especie.⁶⁸ Del mismo modo, la aplicación de la TL parece favorecer una mejor organización de la estructura trabecular del hueso durante la regeneración ósea.⁶⁹ En otro modelo experimental con conejos, la TL también parece facilitar la integración y osificación tanto de autoinjertos como xenoinjertos en aquellos pacientes que reciben la terapia con respecto a los que no.⁷⁰ Junto a estos trabajos, en medicina humana, y principalmente en odontología, la TL ha demostrado mejorar las condiciones óseas de huesos dañados mediante un aumento de densidad y calidad del tejido, así como de la estructuración del mismo.^{71,72}

Otros tipos celulares que se benefician del efecto reparador/regenerador de la TL son las células nerviosas y musculares. Gigo-Benato y cols. mostraron en su trabajo cómo la luz láser favorece la recuperación de la funcionalidad nerviosa en nervios dañados tras traumatismos.⁷³ De igual manera, Alessi y cols. observaron una mayor velocidad de reparación tisular al tratar con TL el músculo esternomastoideo de ratas, después de haber provocado la necrosis muscular del mismo con bupivacaina.⁷⁴ La reparación muscular secundaria a la TL está directamente relacionada con los parámetros de terapia empleados.⁷⁵

La cicatrización de heridas puede suponer el principal objetivo de la TL en cuanto a reparación tisular se refiere. La proliferación de fibroblastos, así como la síntesis de colágeno y queratinocitos en heridas cutáneas también fue descrito por otros autores.^{35,76-79} En resumen, la TL parece ser una herramienta muy útil en el tratamiento de heridas.⁸⁰

Puesto que el tema de estudio del presente trabajo se corresponde en parte al efecto de la TL sobre heridas, este punto será desarrollado más profundamente en la sección correspondiente al uso de la TL en el manejo de heridas (sección 1.7.4.).

1.6.2. ANTIINFLAMATORIO

Cuando un tejido sufre un daño de cualquier etiología, se desencadena en él una serie de reacciones cuyo objetivo principal es la reparación y homeostasis tisular. Dentro de estos fenómenos podríamos destacar la reacción inflamatoria. Este proceso está mediado por factores humorales y celulares, donde las citoquinas juegan un papel muy importante. Se considera que existen citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, aunque algunas de ellas presentan ambas características según las circunstancias. Todas las citoquinas participan en diversos procesos biológicos, y su actuación ha sido demostrada en varios modelos experimentales.⁸¹⁻⁸³

La falta del control de la inflamación en cuanto intensidad o duración puede llevar consigo consecuencias negativas, desde un retraso en la cicatrización a, en casos más extremos, la aparición de un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) generalizado, que a su vez puede desencadenar una disfunción multiorgánica.⁸⁴ Controlar la liberación de mediadores de la inflamación es un punto clave de la TL en el manejo antiinflamatorio.

El papel del NO es extremadamente complejo y variable en función de la cantidad liberada, células implicadas y momento de su liberación. Su síntesis la lleva a cabo la óxido nítrico sintasa (NOS), de la que se han descrito dos isoformas constitutivas del organismo como son la NOS endotelial (NOSe) y la NOS nerviosa (NOSn), y una isoforma no constitutiva como la NOS inducida (NOSi). La expresión de NOSi está asociada a diferentes tipos celulares como los macrófagos, linfocitos y neutrófilos,

relacionados directamente con la respuesta inflamatoria. Regular la producción del NO es fundamental para obtener resultados fisiológicos favorables.

Diversos autores han centrado sus ensayos en el estudio de citoquinas mediadoras de la inflamación y TL. Fernandes y cols. observaron en su ensayo experimental con ratas como la expresión de IL-1 β se veía reducida en aquellos pacientes pertenecientes al grupo que recibió la TL. Para ello, analizaron la cantidad de ARN mensajero de la IL-1 β de la musculatura afectada de la tibia de las ratas del ensayo.⁸⁵ Efectos similares fueron observados por Albertini y cols. en su ensayo con ratas. Mostraron cómo la expresión de ARN mensajero de la IL-1 β , el TNF α o la IL-6 se veía reducido en el punto de inflamación tisular tres horas después de la aplicación de la TL.⁸⁶ Otro efecto antiinflamatorio de la TL parece radicar en la disminución de la expresión de receptores B1 y B2 para la bradiquinina, péptido relacionado con múltiples fases del proceso inflamatorio.⁸⁷ Además, la síntesis y liberación de prostaglandinas inflamatorias, como la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), se ha visto reducida tras la aplicación de la TL.⁸⁸

La modulación de la respuesta celular a un proceso inflamatorio también supone un objetivo importante de la TL. Alves y cols. mostraron en su modelo experimental en sinovitis de ratas como la TL no solo regulaba la liberación de mediadores de la inflamación (IL-1 β , TNF α e IL-6), sino que también reduce la migración de neutrófilos en la fase inflamatoria.⁸⁹ Esta regulación humoral y disminución de la respuesta celular también ha sido observada con el empleo de la TL en otros ensayos de sinovitis articulares.⁹⁰

Limitar el proceso inflamatorio asociado a un daño tisular supone no solo una mejora en el proceso de homeostasis, sino que además tiene un efecto directo en los estímulos nociceptivos generados desde el foco de la herida.

1.6.3. ANALGESIA

El manejo del dolor es un punto crítico tanto en medicina humana como veterinaria. Entender las vías del dolor es importante para entender su fisiología. Estas vías se originan a nivel celular, justo después de que ocurra el daño. Tras esa alteración

inicial, se produce una liberación de mediadores de la inflamación que provocan una señal química que los nociceptores se encargan de transformar en un impulso nervioso en lo que se conoce como transducción. A continuación, esta señal nerviosa viaja (transmisión) hasta la medula espinal, donde es modulada antes de llegar al cerebro. Una vez en el sistema nervioso central, se produce la integración y reconocimiento de la información sensitiva en el proceso denominado percepción.

Se han descrito varios mecanismos por los cuales la TL puede tener un efecto analgésico, además de por la inhibición de mediadores proinflamatorios.

Pereira y cols. mostraron en su ensayo sobre roedores como la TL presenta un efecto anti-nociceptivo mediante el aumento de serotonina, así como de la liberación de β -endorfinas.⁹¹ La serotonina tiene un papel fundamental en la modulación de la respuesta al dolor⁹², mientras que las β -endorfinas actúan a modo de opioides endógenos que bloquean los receptores pre- y post-sinápticos del Sistema Nervioso Periférico (SNP). Este aumento de opioides endógenos secundario a una TL también ha sido descrito por otros autores.⁹³

Otro método de actuación de la TL frente al dolor radica en la inhibición directa de las fibras nerviosas periféricas encargadas de la nocicepción⁹⁴, así como la regeneración de células nerviosas dañadas^{95,96} o inactivadas.⁹⁷

Nicolau y cols. realizaron dos ensayos clínicos acerca de la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular del diafragma de ratones. Observaron como una TL a 830 nm de longitud de onda inhibía la liberación de acetilcolina (ACh), mientras que a 655 nm no se observaba ningún efecto. Esta disminución de ACh favorece que la actividad sináptica del sistema nervioso se vea inhibida a la hora transmitir los estímulos dolorosos.^{98,99}

El aumento del NO sólo favorece un efecto directo sobre la circulación sanguínea, sino que además actúa de neurotransmisor intercelular favoreciendo la inhibición sensitiva del sistema nervioso periférico, así como la liberación de endorfinas.¹⁰⁰ Otros autores también observaron en sus estudios cómo el aumento del NO contribuye al alivio del dolor musculoesquelético de los pacientes sometidos a TL.^{93,101}

La literatura actual presenta diversos estudios donde se muestra la capacidad de la TL en paliar el dolor secundario a patologías concretas como la oosteoartrosis¹⁰²⁻¹⁰⁴, tendinopatías¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ o dolor neuropático entre otros.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

1.6.4. CONTRAINDICACIONES Y PRECAUCIONES DE LA TERAPIA LÁSER

En terapia láser de bajo nivel (Láser Clase III B y IV) la principal razón de precaución y contraindicación de uso son los ojos. Como se ha comentado en otra sección anteriormente, el efecto directo del haz de luz sobre la retina puede provocar la pérdida completa de visión de manera irreversible. El efecto directo sobre las células es amplificado por el cristalino, que concentra varios miles de veces la radiación sobre puntos de la retina. Es por ello que llevar gafas especiales durante las sesiones médicas es obligatorio tanto para el clínico como para los pacientes. Las gafas bloquean las longitudes de onda a las que trabaja el equipo en concreto, y deben ser proporcionadas por el fabricante y cumplir estándares internacionales de calidad. Además, se deberá acondicionar la sala donde se practique este tipo de terapias para evitar exposiciones accidentales de luz por otras personas que no participen en la sesión.

Otras situaciones donde debemos tener precaución en la aplicación de la TL son:

- Inyecciones medicamentosas e infiltraciones articulares. No se debe aplicar TL sobre regiones donde se hayan inyectado fármacos o vacunas hasta que no haya pasado un tiempo suficiente para permitir la absorción completa del producto (sobre 7-10 días de manera estándar). La vasodilatación asociada a la irradiación puede provocar que la absorción de un producto se vea alterada. Además, algunos fármacos son fotosensibles, pudiendo provocar inflamación, edema y dolor en el punto de inyección.

Se recomienda que en aquellos casos que se vaya a realizar infiltración de un fármaco y terapia láser, se aplique la terapia antes de la administración del producto.

- Procesos tumorales. En este punto existen resultados contradictorios. Algunos autores han observado en sus ensayos *in-vitro* sobre células malignas como la TL

aumentaba la proliferación de estos tipos celulares^{111,112}, mientras que otros no.¹¹³ En modelos *in-vivo* ocurre algo similar, donde el empleo de la TL sobre procesos tumorales como el carcinoma de células escamosas puede no presentar efecto sobre las células neoplásicas a dosis de 5 J/cm²¹¹⁴, o incluso favorecer el crecimiento y multiplicación celular con dosis superiores a esa.¹¹⁵

Sin embargo, debido a la multitud de estirpes celulares y a la variabilidad de parámetros de tratamiento, se recomienda no emplear la TL en procesos neoplásicos. Las células neoplásicas presentan una capacidad de crecimiento y multiplicación mayor a otros tipos celulares, y el efecto de la PBM sobre ellas puede favorecer su metabolismo y por consiguiente empeoramiento clínico. Además, es necesario tener en cuenta el efecto proangiogénico de la TL.

- Embarazo. No existe ningún artículo que demuestre un efecto en fetos al aplicar la TL sobre el útero de mamíferos gestantes. Su uso está contraindicado como acto de prudencia médica y legal.
- Líneas de crecimiento. Existe algún estudio experimental en ratas donde se muestra un cierre prematuro de la línea de crecimiento en fémures tratados con TL¹¹⁶, aunque los parámetros empleados no son extrapolables a la práctica clínica. En la actualidad, no hay ningún ensayo ni caso clínico en medicina humana o veterinaria que muestre un efecto adverso de la TL sobre la metafisis de huesos en crecimiento. Al igual que en los casos anteriores, la multitud de parámetros que entran en juego dentro de la TL hacen que su empleo sea controvertido sobre pacientes en crecimiento. Se recomienda, de ese modo, que los parámetros de tratamiento, así como la frecuencia de terapias sean ajustados a cada caso.
- Hemorragias. El efecto vasodilatador de la PBM puede provocar un empeoramiento del sangrado en zonas donde ya existe una hemorragia.⁶⁶ Se recomienda que antes de aplicar TL sobre un tejido con sangrado, se apliquen técnicas de hemostasia tales como presión, electrocoagulación o vasoconstricción por frío entre otros (siempre que sea posible).

- Glándula tiroides. Al tratarse de tejidos metabólicamente muy activos, las aplicaciones repetidas y con densidad de energía altas deben ser evitadas. Terapias puntuales con longitudes de onda de 780 nm y densidad de energía de 4 J/cm², parecen presentar un efecto estimulador de los niveles de hormona tiroidea en ratones, sin observar cambios histológicos sobre la glándula.¹¹⁷

Nuevamente, se recomienda no aplicar TL en regiones cervicales en pacientes con alteraciones de la glándula tiroides, y en aquellos casos que no existan patologías asociadas a las glándulas, los parámetros de tratamiento deben ser ajustados.

- Epilepsia. La luz roja intensa y pulsada puede desencadenar ataques en pacientes con epilepsia fotogénica. La mayoría de los equipos láser emiten luz no visible, aunque la pieza de mano suele presentar una luz roja y por lo tanto se recomienda no aplicar TL en pacientes epilépticos. Esto es especialmente importante si el tratamiento se centra en regiones cráneo-cervicales, tanto por el estímulo directo al penetrar la luz en el SNC como por la modificación del flujo sanguíneo al cerebro.
- Falsas contraindicaciones. La terapia láser se puede emplear sobre material ortopédico/protésico. Diversos artículos, especialmente aquellos llevados a cabo en odontología, muestran como la TL presenta efectos beneficiosos en la osteointegración de implantes dentales cuando se emplean sobre modelos animales de experimentación.¹¹⁸⁻¹²⁰

Por otro lado, el tratamiento con TL de las gónadas masculinas no se aconseja, ya que el calentamiento de éstas puede provocar una disminución de la calidad/funcionalidad espermática o incluso su muerte celular. Sin embargo, se han descrito posibles efectos beneficiosos, como el aumento de la movilidad espermática *in-vitro*¹²¹ o la propia espermatogénesis en un modelo experimental sobre ratas.¹²²

Otra razón de precaución en el uso de la TL son las infecciones bacterianas. El efecto de la TL sobre los microorganismos ha sido estudiado durante las últimas décadas. Sin embargo, como en los casos anteriores, no se ha llegado a ningún

consenso respecto a las pautas de tratamiento, así como de los resultados. Es por ello que, en el presente trabajo, se pretende analizar el efecto de la TL sobre bacterias cuando estas son irradiadas directamente en un modelo experimental *in-vitro*, así como al tratar heridas contaminadas de pacientes caninos.

1.7. HERIDAS

Se denomina herida a la interrupción de la continuidad de la superficie externa del organismo o un órgano interno. Las heridas pueden tener un origen traumático o metabólico. Generalmente las heridas cicatrizan en pocos días o semanas, sin embargo, existen ciertas condiciones que pueden producir un retraso de la cicatrización.

1.7.1. PROCESO DE CICATRIZACIÓN

El proceso de cicatrización que sigue una herida sana en un paciente sano se inicia justo después de producirse el daño y consta de tres fases que se solapan entre ellas.

- Fase inflamatoria (0-4 días) Se desencadena una vasoconstricción inicial y la liberación de epinefrina, norepinefrina y prostaglandinas. Este mecanismo suele durar de 5 a 10 minutos y desencadena la aparición de los signos clásicos de la inflamación (enrojecimiento, edema, calor y dolor) debido al aumento de la permeabilidad vascular. A continuación, se produce una respuesta hemostática mediante la agregación plaquetaria y la activación de la vía intrínseca de la cascada de coagulación.

El aumento de la permeabilidad vascular facilita la salida de los glóbulos blancos hacia la herida. Los neutrófilos se encargan de fagocitar los detritus celulares, así como los patógenos que se asientan en la herida. Los monocitos, que posteriormente se transforman en macrófagos, participan en la fagocitación de microorganismos y detritus, remodelación tisular y la síntesis y secreción de factores de crecimiento que favorecerán la angiogénesis y el reclutamiento de células mesenquimales.

- Fase de reparación (3-21 días). Se compone a su vez de tres procesos.
 - Fibroplasia. En esta fase se produce la síntesis de proteoglicanos y colágeno, y la proliferación de fibroblastos. La mayor concentración de colágeno se produce aproximadamente a las 2-3 semanas, e inicialmente hay un predominio del colágeno tipo III. Además, se produce una contracción de la herida por la acción de los miofibroblastos.

El resultado de esta fase es la formación de un tejido fibroso.

- Angiogénesis (No antes del cuarto día). Se produce una nueva red vascular que penetra en la herida y la nutre ayudando así a la formación del tejido de granulación.
 - Epitelización. Los queratinocitos de los bordes de la herida migran a la zona afectada con el fin de restablecer la barrera cutánea. Esta fase finaliza con el restablecimiento de la epidermis.
- Fase de maduración (Desde el día 9 hasta incluso 2 años después) Se produce el fortalecimiento de las fibras de colágeno recién formado; hay un mayor depósito de colágeno y una sustitución progresiva del tipo III por tipo I, que al tener mejor disposición espacial proporciona mayor fuerza ténsil en la herida.

Como se ha comentado, existen diversos factores locales y sistémicos que pueden retrasar la cicatrización. Dentro de los factores locales podemos mencionar las infecciones bacterianas y/o fúngicas, la hipoxia, la existencia de tejido no viable¹²³, la aparición de edemas y/o hematomas o incluso factores mecánicos. Dentro de los factores sistémicos podemos incluir el tratamiento con corticoesteroides o quimioterápicos, endocrinopatías, síndromes paraneoplásicos o enfermedades autoinmunes entre otros.

1.7.2. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE LAS HERIDAS

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (*Center for Disease Control and Prevention*, CDC) publicó en 1985 una guía donde se definió la clasificación de las heridas según su grado de contaminación. Esta guía fue modificada en 1992 y actualmente reconoce las siguientes clases¹²⁴:

- Clase 1 - Heridas limpias. Heridas quirúrgicas donde no se observa inflamación y donde no se incluyen cirugías del tracto respiratorio, digestivo o genito-urinario, ni se accede a tejidos infectados.
- Clase 2 - Heridas limpias-contaminadas. Heridas quirúrgicas donde el tracto respiratorio, digestivo o genito-urinario están incluidos, pero no se observa signos de contaminación o infección.
- Clase 3 - Heridas contaminadas. Incluye heridas accidentales, abiertas y recientes además de heridas quirúrgicas donde hay derramamiento de contenido procedente del tracto digestivo. Las incisiones quirúrgicas con inflamación no purulenta también se encuentran dentro de este grupo.
- Clase 4 - Heridas sucias-infectadas. Heridas traumáticas no recientes con abundante tejido desvitalizado, así como signos claros de infección o perforación visceral.

1.7.3. HERIDAS TRAUMÁTICAS CONTAMINADAS

Según el sistema de clasificación anterior, la única herida traumática limpia es aquella que se realiza de manera controlada en cirugía. El resto de heridas deben considerarse al menos como contaminadas.¹²⁵

La presencia de patógenos en un tejido dañado desencadena la liberación de toxinas por parte de las propias bacterias y de la lisis celular. Esto puede alterar la cicatrización normal, inhibiendo la solidez del entramado fibroso, retrasando la contracción y epitelización, y, en resumen, prolongando la fase inflamatoria.

Anteriormente, hemos incluido este proceso dentro de los factores locales de retraso de la cicatrización.

El tiempo óptimo para tratar una herida traumática accidental contaminada es durante las primeras 6 horas.¹²⁵⁻¹²⁷ A partir de ese momento, aumenta el riesgo de que la herida pase de ser una herida contaminada a una herida infectada. Entre los factores de riesgo está la cantidad y tipo de carga bacteriana¹²⁸, y las condiciones del ambiente de la herida: presencia de necrosis, oxigenación, edema, etc. Las heridas por mordisco en perros y gatos representan el 10 y 15%, respectivamente, de las causas de traumatismo en la clínica veterinaria.¹²⁹ Todas las heridas secundarias a un mordisco deben ser consideradas contaminadas, incluso aquellas que no sean abiertas.¹³⁰ La presencia de bacterias procedentes de la boca del atacante, así como las bacterias propias de la piel de la víctima determinan ese grado de contaminación inicial en este tipo de heridas.¹³¹

El riesgo de infección no solo radica en la contaminación inicial o la posible colonización secundaria, sino que también depende en gran medida de otros procesos asociados al mordisco como son el efecto cizalla y de aplastamiento que produce la mandíbula sobre los tejidos. Un mordisco generalmente conlleva la desvitalización del tejido involucrado, la aparición de espacios muertos, sangrados y compromisos vasculares entre otros efectos. Esto desencadena una respuesta inflamatoria que en función del daño tisular puede originar un SIRS que comprometa las funciones biológicas del organismo.¹³² Estabilizar a los pacientes inestables, así como realizar un correcto manejo de la herida es de vital importancia para garantizar una rápida y completa recuperación.

Otros ejemplos de heridas traumáticas contaminadas son aquellas ocasionadas por armas de fuego y/o armas blancas, secundarias a atropellos, o cortes accidentales con cristales o materiales metálicos.

El manejo de las heridas dependerá de muchos factores como son: la localización, extensión, compromiso vascular, grado de contaminación/infección, etiología del traumatismo y del propio paciente. Además de técnicas quirúrgicas y tratamientos médicos, actualmente existen multitud de métodos disponibles para el

manejo de heridas como la terapia con oxígeno hiperbárico¹³³, el uso de células madre¹³⁴, plasma rico en plaquetas (PRP)¹³⁵, terapia con ondas de choque extracorpóreas¹³⁶, estimulación eléctrica^{137,138}, terapia con ultrasonidos¹³⁹, sistemas de presión negativa^{140,141} o incluso el empleo de agentes naturales como el Aloe Vera¹⁴², la miel¹⁴³ o la cúrcuma.¹⁴⁴

1.7.4. USO DE LA TERAPIA LÁSER EN EL MANEJO DE HERIDAS

La aplicación de TL sobre condiciones de la piel representa el segundo mayor campo de actuación de la PBM en veterinaria por detrás de las condiciones musculoesqueléticas.¹⁴⁵

El efecto primario de la TL sobre las heridas se origina en la interacción entre los fotones emitidos y los cromóforos de las células diana (ej. fibroblastos, queratinocitos o células endoteliales). La absorción de energía por parte de la mitocondria celular produce una mayor eficiencia de la cadena respiratoria y de la producción de ATP.¹⁴⁶ La amplificación de ese primer efecto conllevará un aumento del metabolismo celular y la regulación de vías de respuesta para la cicatrización de la herida como la migración celular, la síntesis de ADN y ARN, mitosis celular, secreción de proteínas y proliferación celular, así como un aumento del estallido respiratorio (formación de ROS entre otros). Los efectos celulares secundarios a esta mejora del metabolismo son la activación de fibroblastos, macrófagos, linfocitos, síntesis de factores de crecimiento, modulación de neurotransmisores o mejora de la permeabilidad de la membrana celular, entre otros.

El uso de la TL puede aportar beneficios tanto en heridas quirúrgicas limpias¹⁴⁷, como en quemaduras^{123,148}, úlceras crónicas⁵⁷, injertos y colgajos^{149,150}, o heridas con cierre por segunda intención.¹⁵¹ Esto se debe al efecto en la proliferación celular, vascularización y disminución de la inflamación, entre otros.

La reducción de la inflamación se ha evidenciado en diversos estudios donde se han cuantificado los niveles de mediadores de la inflamación como la prostaglandina E2¹⁵², leucocitos¹⁵³ o el factor de necrosis tumoral (TNF- α) entre otros.¹⁵⁴ Algún autor describe el efecto estimulador de la quimiotaxis leucocítica al tratar quemaduras con TL.¹⁵⁵ Sin embargo, la mayoría de los artículos coinciden en la disminución de la

proliferación de leucocitos durante el proceso de reparación tisular, correspondiendo así al efecto antiinflamatorio de la TL.^{151,156-158}

Por otro lado, Stadler y cols. comprobaron en su ensayo *in-vivo* con animales de experimentación como la TL por una parte disminuye el tiempo de la fase inflamatoria de la herida y por otra favorece la epitelización y la fase de maduración al tratar heridas cutáneas de ratones.¹⁵⁹ En otro ensayo se utilizó la proteína C reactiva como marcador de la inflamación, y se observó que los pacientes sometidos a exodoncias que recibían TL presentaban una menor cantidad de este marcador en comparación con los que no fueron tratados.¹⁶⁰ Estos ejemplos complementan lo comentado anteriormente en la sección del efecto antiinflamatorio de la TL.

La regulación y aumento del NO extracelular por parte de la TL favorece el efecto antiinflamatorio por aumento directo de la vasodilatación y un mayor aporte sanguíneo en la herida.⁶⁶ Además, el NO regula procesos como la supresión de la respuesta inflamatoria, angiogénesis, inhibición de la apoptosis y migración celular.¹⁶¹ Otros modelos de ensayo en animales analizan histológicamente la evolución de las heridas tratadas con TL y muestran una mejora del aporte sanguíneo de la zona afectada. De esa manera, se ha evidenciado una mayor proliferación capilar en heridas de ratas irradiadas, lo que favorece la revascularización y un mejor tejido de granulación.¹⁶² Meirelles y cols. también observaron en su ensayo sobre roedores como la TL favorecía la creación de nuevos capilares mediante el estudio histopatológico de las heridas irradiadas.¹²³ Por su parte, Ribeiro y cols. emplearon sobre heridas por quemaduras en ratas un láser He-Ne y observó cómo se favorecía la cicatrización de las heridas mediante el aumento de la circulación sanguínea y una más temprana aparición del tejido de granulación y de la epitelización.¹⁶³

Hopkins y cols. comprobaron que con el empleo de un láser de diodo existía una mayor contracción de las heridas irradiadas con respecto a las no irradiadas.¹⁶⁴ Esta mejora fue estudiada a nivel histológico, y parece estar relacionada con una mejor distribución del colágeno tipo I y III durante el periodo de cicatrización de la herida¹⁶⁵, así como por la estimulación en la proliferación de fibroblastos.¹⁶⁶ Medrado y cols. también observaron que la disminución de la fase inflamatoria, y una mayor proliferación de colágeno y miofibroblastos en la fase de remodelación tisular, parece

favorecer el proceso de cicatrización en heridas de ratas tratadas con TL.¹⁶⁷ Por otra parte, Yu y cols. observaron sobre cultivos de queratinocitos humanos, como la TL favorecía la expresión del ARN mensajero para la IL-1 α e IL-8, las cuales favorecían la migración y proliferación de los mismo.¹⁶⁸ Ese mismo autor, con otro grupo de trabajo, observó al tratar pacientes humanos con vitíligo como la estimulación de los queratinocitos favorecía la proliferación y migración de melanocitos hacia zonas despigmentadas.¹⁶⁹ Gagnon y cols. también observaron un efecto favorable en la proliferación y migración de queratinocitos al emplear la TL sobre un cultivo epidérmico canino.¹⁷⁰

El uso de la TL en el tratamiento de heridas ha demostrado multitud de efectos positivos en cada una de las fases que compone la cicatrización, pero el tratamiento de heridas infectadas sigue siendo cuestionado a raíz de la falta de homogeneidad de los resultados de trabajos *in-vivo* e *in-vitro*.

1.7.5. POSIBLE EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA TERAPIA LÁSER

La capacidad de cicatrización de las heridas depende de los factores propios de la cicatrización, así como de los factores que rodean a la misma como son el propio organismo y el ambiente. La condición más común que impide o retrasa la cicatrización son las infecciones.¹⁷¹ A pesar del creciente conocimiento en cuanto al manejo de las heridas se refiere, las infecciones bacterianas y fúngicas asociadas a una herida representan un punto de inquietud en la práctica médica debido a la importante causa de morbilidad y mortalidad que representan.¹⁷² Además de los riesgos físicos, la instauración de infecciones supone un aumento significativo de los costes de los tratamientos.^{173,174}

Los microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia en las heridas infectadas son: *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *P. aeruginosa*.¹⁷⁵ En las heridas infectadas suelen encontrarse distintos microorganismos que actúan de manera sinérgica.¹⁷¹

El uso de antibióticos en el tratamiento de heridas es controvertido.^{176,177} Inicialmente, el empleo de antibióticos debe limitarse al momento en el que la infección

se ha instaurado sobre una herida.¹⁷⁸ El uso de antibióticos preventivos no parece disminuir la posibilidad de infección, incluso en heridas por mordiscos.¹⁷⁷ En heridas contaminadas, el lavado, desbridamiento y las terapias locales deberían ser suficiente para disminuir el riesgo de una infección. Hoy en día contamos con numerosas estrategias de manejo local como pueden ser el uso de soluciones de irrigación antisépticas de clorhexidina, hipoclorito o Tris-EDTA^{177,179,180}, o técnicas de desbridamiento selectivo mediante la aplicación de agentes enzimáticos como colagenasas, tripsinas, proteasas o bromelaína entre otros.^{181,182} Además, el empleo de vendajes y apósitos (ej. alginato de calcio, hidrogeles, hidrocoloides...) permitirá mantener una humedad y temperatura ideal sobre la superficie de la herida favoreciendo el desbridamiento autolítico de la misma.¹⁸³⁻¹⁸⁵

Como se comentó anteriormente, si los mecanismos de defensa se ven superados por la actividad microbiana, tiene lugar una multiplicación bacteriana seguida de una colonización que desencadena que una herida contaminada se convierta en una herida infectada.

En aquellos casos en los cuales sea necesario emplear antibióticos sistémicos se deben conocer las rutas de actuación de los mismos, así como los tipos de patógenos frente a los que son más efectivos. Los antibióticos actúan inhibiendo algunas de las funciones de los patógenos y/o sobre las vías metabólicas de los mismos. Se han determinado hasta cuatro métodos de actuación: inhibición de la síntesis de la pared celular, bloqueo de vías metabólicas, interferencia en la síntesis de proteínas e inhibición de la síntesis de ácido nucleico.¹⁸⁶

En una herida infectada el método de actuación ideal parte de la toma de muestras para realizar aislamiento e identificación de los microorganismos implicados y su correspondiente antibiograma.¹⁸⁷ Los microorganismos resistentes a los antibióticos han aumentado considerablemente en gran parte por el uso abusivo e incorrecto de los mismos.¹⁸⁸ Dado el actual problema de los patógenos multirresistentes, en las últimas décadas están ganando especial interés aquellas terapias que minimizan el empleo de antibióticos.

En particular, las cualidades de agentes naturales como la cúrcuma¹⁸⁹, aceites esenciales¹⁹⁰⁻¹⁹² o la miel han ganado mucha importancia en el tratamiento tópico de este tipo de patologías.^{193,194} El empleo de productos con base de plata¹⁹⁵, oro¹⁹⁶ o zinc^{197,198} parecen presentar baja toxicidad tisular pero un buen efecto bacteriostático y bactericida a nivel local. Otro método de tratamiento de heridas infectadas consiste en el desbridamiento biológico mediante larvas de *Phaenicia sericata*.¹⁹⁹ Este tipo de organismos no solo permite eliminar los detritus celulares sino también lisar bacterias como el MRSA.²⁰⁰

Los posibles efectos antimicrobianos de la TL también han ganado interés en las últimas décadas, donde diversos autores han centrado sus investigaciones acerca del efecto de la TL sobre las bacterias tanto en ensayos *in-vitro* como *in-vivo* con animales de experimentación. Los resultados son controvertidos debido principalmente a la heterogeneidad de la metodología empleada, en especial en cuanto a parámetros de irradiación se refiere.

De esa manera, algunos ensayos *in-vitro* describen un efecto antimicrobiano de la PBM al ser empleada de manera directa sobre cultivos de distintos tipos bacterianos^{201,202}, mientras que otros estudios incluso observan un efecto estimulador del crecimiento bacteriano tras aplicar la TL.²⁰³ Nussbaum y cols. sugieren que las características propias de cada tipo de bacteria (tipo de pared celular, cromóforos bacterianos, etc.) determinarán los efectos de la terapia láser.²⁰⁴

El empleo de la TL en animales de experimentación ha permitido observar el efecto de la irradiación sobre los microorganismos cuando estos se encuentran en seres vivos, y en especial cuando se emplea sobre heridas infectadas. Diversos estudios muestran en sus resultados un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano tras aplicar la TL en este tipo de lesiones.^{72,205,206} Estos resultados son propios de cada tipo de terapia, así como de la metodología del ensayo, donde además se sugiere que el empleo de la TL durante varios días consecutivos parece tener un efecto acumulativo que favorece el efecto bacteriostático de la PBM.²⁰⁷ Un posible efecto sinérgico también ha sido observado por otros autores al emplear la TL junto con una terapia antibiótica en el tratamiento de úlceras cutáneas crónicas infectadas en seres humanos.⁵⁷ Además, la

TL también parece presentar un efecto beneficioso en el tratamiento de infecciones más profundas a la piel como puedan ser una osteomielitis²⁰⁸ o una rinosinusitis.²⁰²

El efecto bactericida/bacteriostático por parte de la PBM sobre las bacterias parece proceder de un posible efecto directo de la luz sobre las porfirinas endógenas de los microorganismos, que actuarían a modo de cromóforos intracelulares²⁰⁹, así como del efecto indirecto secundario a todos los fenómenos que desencadena la TL sobre el tejido afectado como la oxigenación tisular, activación de macrófagos, producción de ROS o estimulación del sistema inmune entre otros.^{167,174,210–212}

No existe hasta la fecha ningún ensayo clínico sobre pacientes caninos en los que se valore de manera directa el efecto fotobiomodulador de la TL sobre la carga bacteriana de heridas contaminadas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

- El uso de la terapia láser de bajo nivel, como terapia coadyuvante a un tratamiento estándar, disminuye la carga bacteriana de heridas contaminadas en pacientes caninos.
- El empleo de la terapia láser de bajo nivel en un modelo experimental *in-vitro* sobre bacterias gram negativas presenta un mayor efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano en comparación con bacterias gram positivas.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVOS PRINCIPALES

- Evaluar la actividad antimicrobiana de la terapia láser de bajo nivel como terapia coadyuvante a un tratamiento estándar sobre heridas contaminadas en pacientes caninos.
- Evaluar el efecto de la terapia láser de bajo nivel sobre *Staphylococcus intermedius* y *Escherichia coli* al emplearla de manera directa en un modelo experimental *in-vitro*.

2.2.2. OBJETIVO SECUNDARIO

- Evaluar la evolución inicial de las heridas contaminadas/infectadas de los pacientes caninos mediante una escala de puntuación numérica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo consta de dos partes: por un lado, se pretendió observar el efecto de la TL al tratar heridas contaminadas en pacientes caninos, estudio que denominaremos “Ensayo *in-vivo*”, y, por otro lado, el efecto directo de la TL sobre dos microorganismos distintos, que denominaremos “Ensayo *in-vitro*”.

El ensayo fue aprobado por los Comité de Ética de Experimentación Animal del Hospital Clínico Veterinario Complutense (nº de referencia 03/2015) y de la Universidad Alfonso X “el Sabio”.

3.1. ENSAYO *IN-VIVO*

3.1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un ensayo clínico prospectivo, controlado, aleatorizado, ciego del observador y análisis enmascarado, dividido en tres grupos paralelos.

La inclusión de cada uno de los pacientes se realizó de manera aleatoria en uno de los tres grupos de los que constaba el ensayo clínico.

El único conocedor del grupo al cual pertenecía cada paciente fue el investigador principal, que aplicaba el tratamiento. Tanto el propietario, como el resto de investigadores (incluidos el estadístico, el microbiólogo y los dos evaluadores) desconocían el grupo asignado a cada paciente.

El propietario era conocedor de la posibilidad de que su mascota fuera incluida en cualquiera de los grupos, incluido el grupo de terapia láser placebo. La firma del consentimiento informado sirvió de confirmación de dicho acuerdo (Documento adjunto 1).

El resto de investigadores conoció el grupo asignado a cada paciente una vez que las muestras fueron procesadas y analizadas, y tras realizar la valoración ciega de las fotos de las heridas.

La evaluación del efecto de la TL sobre la carga bacteriana se realizó comparando las unidades formadoras de colonias (UFC) por cm² a las 72 horas de los cultivos pre- y post-tratamiento, y mediante la valoración visual de la evolución de las heridas durante

el periodo de ensayo por dos evaluadores que desconocían a que paciente pertenecía cada una de las heridas valoradas.

3.1.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Para la realización del estudio se incluyeron los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión en el periodo comprendido entre julio y octubre de 2017.

- Criterios de inclusión. Las premisas necesarias para participar en el estudio fueron:
 - Pacientes caninos.
 - Presentar, al menos, una herida traumática contaminada, entendiendo como herida contaminada todas aquellas heridas Clase III (según la clasificación de la CDC) accidentales y abiertas.¹²⁴
 - Pacientes que no hubieran recibido tratamiento antimicrobiano en el mes anterior.
- Criterios de exclusión.
 - Pacientes que acudieran en estado de shock.
 - Pacientes agresivos.
 - Pacientes que necesitaran alguna intervención bajo anestesia general durante el periodo de estudio.
 - Pacientes con alergias médicas conocidas.
 - Pacientes epilépticos.
 - Pacientes con patologías oncológicas asociadas a la herida del estudio.
 - Pacientes con heridas localizadas en región tiroidea.
 - Hembras gestantes con heridas en región abdominal.
 - Pacientes con heridas con sangrado activo.
 - Pacientes que hubieran recibido tratamiento antimicrobiano en el último mes o en el momento de presentación

Al no existir ningún otro estudio al respecto, se decidió calcular el tamaño muestral definitivo a partir de un análisis estadístico preliminar de los pacientes incluidos durante los primeros 4 meses del estudio piloto. Los resultados obtenidos en

ese primer análisis fueron estadísticamente significativos y no se incluyó ningún paciente más.

3.1.3. DEFINICIÓN DE VARIABLES

En el estudio se incluyeron una serie de variables dependientes e independientes.

- Variable dependiente.

Se eligió como variable dependiente el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por cm² de superficie de muestreo/tratamiento a las 72 horas de incubación de los cultivos post-tratamiento en cada paciente. Para el análisis estadístico se realizó el logaritmo neperiano (LN) de las UFC de dichos cultivos. Esta variable se representó mediante un valor numérico.

- Variables independientes

Las variables independientes fueron divididas en cuatro grupos.

▪ Variables clínicas generales.

- Raza. Se recogió la raza de cada uno de los pacientes. Aquellos pacientes cuya raza no se encontrase registrada en la *Fédération Cynologique Internationale* (FCI) se denominaron “mestizo”.
 - Pacientes de raza.
 - Pacientes mestizos.
- Edad. Se consideró la edad que presentaban los pacientes en el momento del ingreso. Esta variable se representa en años.
- Sexo. El sexo del paciente se recogió como macho o hembra.
- Estado reproductor. Los pacientes se clasificaron como castrados o no castrados, según estuvieran gonectomizados o no.
- Peso. Se consideró el peso de los pacientes en momento de la primera consulta. Esta variable se representa en kilogramos (kg.)

- Variables específicas de la herida.
 - Número de heridas. Se recogió el número total de heridas que presentaba cada paciente. Tan sólo una de ellas se incluyó en el experimento. Esta variable se representa como:
 - Una herida (1)
 - Más de una herida (>1)
 - Etiología. Todas las heridas tenían un origen traumático, pero las dividimos en: mordiscos y accidentales. Por herida accidental entendemos todas aquellas que no fueron secundarias al ataque de otro animal.
 - Localización. Recogimos la localización de la herida sometida a la irradiación. Incluimos las heridas en dos grandes zonas que fueron: extremidades y tronco. El tronco representaba tanto la región torácica como abdominal en cada una de sus posiciones anatómicas. Cualquier otra localización se denominó como extremidad (cabeza, cola, miembros anteriores y miembros posteriores).
 - Área. Centímetros cuadrados de la herida (cm²). Se trata de una medición de superficie, no de profundidad.
- Variables específicas del tratamiento.
 - Tratamiento estándar, es decir, el tratamiento médico y el manejo propio de la herida que fue llevado a cabo de igual manera para todos los pacientes del ensayo.
 - Tratamiento médico. Recoge el tratamiento antibiótico empleado para todos los pacientes con cefovecina.
 - Manejo de la herida. Recoge el lavado con 50 mililitros (ml) de suero Ringer Lactato (SRL) por cm² de herida, a una presión de 300 mmHg.

- Tratamiento médico adicional. Se recogieron todos los medicamentos adicionales que se añadieron al tratamiento de los pacientes.
 - Meloxicam. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
 - Tramadol. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
 - Famotidina. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
 - Doble antibioterapia. Cualquier otro antibiótico distinto de la cefovecina. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
- Manejo adicional de la herida. Se recogieron todos los tratamientos adicionales que se utilizaron en el manejo de la herida.
 - Puntos de sutura. Implica la colocación de suturas para cerrar total o parcialmente la herida. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
 - Drenajes pasivos. Implica la colocación de drenajes para facilitar la evacuación de exudados de espacios muertos. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
 - Vendaje. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
- Terapia láser. Incluye cada uno de los tres grupos (dosis o densidad de energía) de tratamiento del ensayo (ver sección - 3.1.6. Terapia láser).
 - Grupo A. Densidad de energía de 6 J/cm²
 - Grupo B. Densidad de energía de 2 J/cm²
 - Grupo C. Terapia láser placebo
- Área irradiada. Centímetros cuadrados (cm²) tratados con la terapia láser. Incluía el área de la herida y tejido sano circundante a la misma. Esta área fue delimitada con moldes de áreas conocidas:

- 25 cm²
- 50 cm²
- 100 cm²

Para poder ponderar los resultados, y como se indica más adelante, los resultados se dividieron por los cm² del área de irradiación/muestreo.

- Sedación. Define la variable en la que los pacientes fueron sedados para llevar a cabo el primer manejo de la herida. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
 - Hospitalización. Define la variable en la que los pacientes fueron ingresados en el centro veterinario y su estancia se prolongó al menos durante 24 horas. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
 - Enfermedades concurrentes. Recoge enfermedades que el paciente padece de manera crónica y para las que recibe tratamiento médico distinto a un antibiótico. En ella se incluyó enfermedades metabólicas, infecciosas y neoplásicas. Esta variable se representó como “sí” o “no”.
- Variables microbiológicas
- UFC/cm² de superficie de muestreo/tratamiento a las 72 horas de incubación de los cultivos pre-tratamiento en cada paciente. Para su inclusión estadística se realizó el logaritmo neperiano de los mismos. Esta variable se representó mediante un valor numérico.
 - Tiempo. Esta variable indica el número de horas que transcurrieron entre las tomas de muestras para cada paciente. Se representó en horas.

- Número de colonias morfológicamente distintas en los cultivos previos a cualquier tratamiento en cada paciente. Esta variable se representó mediante un valor numérico.
- Número de colonias morfológicamente distintas en los cultivos posteriores al tratamiento de cada paciente. Esta variable se representó mediante un valor numérico.

Todas las variables fueron doblemente recogidas en: una hoja única por paciente (Documento adjunto 2) y en la base de datos del hospital, utilizando el programa informático veterinario Qvet®.

3.1.4. ASPECTOS GENERALES

- Centros participantes.

Este trabajo se llevó a cabo de manera conjunta entre dos centros: el Hospital Clínico Veterinario Alfonso X “el Sabio”, organismo perteneciente a la Universidad Alfonso X “el Sabio” de Madrid (HCV-UAX), y el Servicio de Microbiología y Parasitología (Departamento de Sanidad Animal, UCM) del Hospital Clínico Veterinario Complutense.

- Formación del personal veterinario.

Todos los veterinarios del área de pequeños animales del HCV-UAX fueron informados acerca de este estudio, de manera que podían ofrecer la participación en el a todos aquellos propietarios cuyos perros cumplieran los criterios de inclusión, tanto en horario normal como los que acudían de urgencias. Además, se facilitaba un folleto informativo general del ensayo.

- Recepción de los pacientes.

Una vez que el propietario aceptaba y firmaba el consentimiento informado, el paciente fue tratado por el investigador principal hasta su alta clínica.

Por cada paciente se realizó una valoración de la localización y área de las heridas que pudiera presentar. En aquellos casos en los que un paciente presentara más de una herida, tan solo una de ellas era incluida en el ensayo.

Se destinó el quirófano denominado de procedimientos sucios del HCV-UAX para el manejo de cada paciente. Esta sala se acondicionó para cumplir la normativa de seguridad indicada para trabajar con un láser Clase IV. Para ello, se taparon los dos cristales de los que disponía la puerta de entrada al quirófano y se señalizó dicha puerta con un cartel identificativo de terapia láser (Figura 6).

Figura 6. Cartel identificativo de zona de radiaciones láser.



Fuente: UNE EN 60825-1/A2

- **Sedación.**

Se decidió sedar al paciente bajo las siguientes premisas:

- Pacientes nerviosos que fueran a imposibilitar la toma de muestra, terapia láser y manejo de la herida.
- En aquellos pacientes en los que el manejo de la herida incluyera la colocación de drenajes y/o puntos de sutura.

El protocolo de sedación empleado incluyó dexmedetomidina (0,005-0,01 mg/kg) (Dexmopet[®], Fatro, España), metadona (0,3 mg/kg) (Semfortan[®], Dechra, España) y midazolam (0,2 mg/kg) (Midazolam Normon[®], Normon, S.A., España). Este protocolo se adaptó a cada paciente de acuerdo a su examen físico general y

enfermedades concurrentes, variando la dosis de dexmedetomidina en el rango indicado.

- **Hospitalización.**

De manera general, todas las intervenciones llevadas a cabo en los pacientes del ensayo son consideradas procedimientos ambulatorios que no requieren hospitalización. Sin embargo, algunos de los pacientes fueron ingresados debido principalmente a:

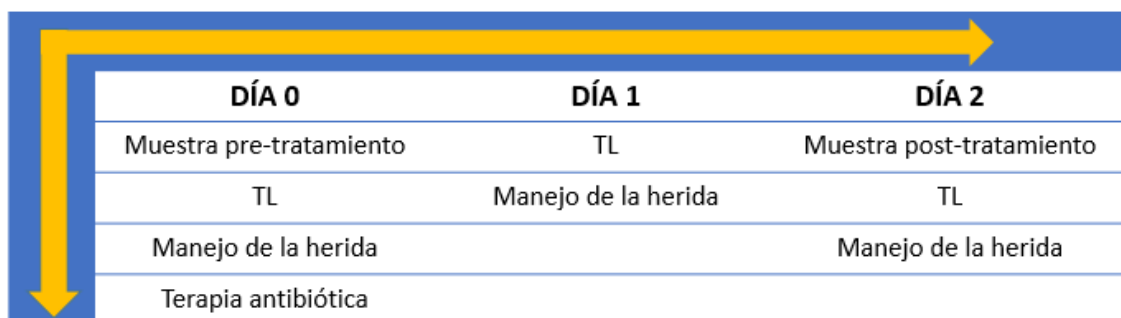
- Voluntad del propietario por la comodidad de revisión de los pacientes los días sucesivos del ensayo.
- Gravedad del proceso que requería un control adicional de otros signos no relacionados con el tema de este ensayo (ej. Traumatismos torácicos).

En el análisis estadístico esta variable no se analizó según las razones de ingreso, sino que tan sólo se tuvo en cuenta si el paciente fue o no hospitalizado.

- **Cronograma del ensayo.**

El día del ingreso (día 0) se realizó la toma de la muestra pre-tratamiento previo a la aplicación de la TL, manejo de la herida y tratamiento antibiótico con cefovecina. El día 1 tan sólo se repitió la TL y el manejo propio de la herida. Por último, el día 2, se volvió a realizar la toma de la segunda muestra (muestra post-tratamiento) antes de llevar a cabo la TL y manejo de la herida (Figura 7).

Figura 7. Cronograma del ensayo clínico para cada paciente.



	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2
Muestra pre-tratamiento		TL	Muestra post-tratamiento
TL		Manejo de la herida	TL
Manejo de la herida			Manejo de la herida
Terapia antibiótica			

*TL- Terapia láser

3.1.5. TOMA DE MUESTRAS

Previo a la toma de la primera muestra microbiológica se realizó el rasurado del pelo con maquinilla y la aspiración suave con una aspiradora destinada exclusivamente para ese fin en el hospital. Con la zona rasurada se procedió a elegir el molde que delimitara el área total de la herida y que además incluyera un mínimo de 2 cm de tejido sano circundante a la misma.

Para cada una de las muestras tomadas se contó con los siguientes materiales:

- Molde de silicona estéril. Los moldes se fabricaron a partir de una pieza íntegra de silicona de 1 mm de espesor y opaca (Wenko®, Leroy Merlin, España). Se crearon un total de 12 moldes. Cuatro de ellos presentaban un área de 25 cm², otros cuatro un área de 50 cm² y el resto un área de 100 cm². Para cada una de las áreas se fabricaron dos moldes cuadrados y otros dos moldes rectangulares. Todos los moldes fueron esterilizados de manera previa a su uso mediante el sistema de esterilización por plasma de peróxido de hidrógeno del que disponía el hospital (Human meditek TS-80®, Medical Expo, España).
- Hisopo estéril de algodón. Se empleó para la recolección de la muestra un hisopo de madera con uno de los extremos de algodón, envasado en tubo de polipropileno estéril (Deltalab, España).
- Un tubo de recolección de líquidos. Tubo de plástico hermético y estéril de 12 mililitros de capacidad (Deltalab, España). El tubo empleado para la toma de la muestra pre-tratamiento se denominó tubo nº 1.

Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline – PBS pH 7,2) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Por cada tubo nº 1 se empleó 1 mililitro (ml) de PBS estéril. El PBS se esterilizó en autoclave (36L®, Selecta, España) a una temperatura de 121°C. El PBS se dispensó en partes alícuotas de 3 ml por tubo en cabina de flujo laminar y con pipetas estériles (Deltalab, España), guardando condiciones de asepsia.

Dentro del área de tratamiento delimitada por el molde de silicona estéril, se realizaron tres pases para la recolección de la muestra microbiológica con la ayuda del hisopo de algodón estéril previamente humedecido en el mililitro de PBS del tubo nº1.

Se deslizó el hisopo por toda la superficie delimitada mediante un pase en horizontal, otro en vertical y otro transversal. Una vez recogida la muestra, se retiró la mayor parte del vástago de madera y se introdujo el algodón dentro del tubo nº 1. Este tubo fue sometido a la acción de un agitador tipo Vortex (Corning®, Thermo Fisher Scientific Inc., España) a máxima potencia durante 30 segundos. Después se abrió el tubo en cabina de flujo laminar y con la ayuda de unas pinzas estériles se presionó el algodón contra las paredes del mismo para recuperar el líquido embebido. Tras ello se eliminó el algodón y se cerró el tubo hasta su procesado en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM con un máximo de 1 hora de intervalo entre recogida y procesado.

Se tomaron un total de dos muestras microbiológicas por cada paciente. La primera de ellas se llevó a cabo el día del ingreso (día 0) previo a la aplicación de la TL, manejo de la herida y administración del tratamiento médico. La segunda de las muestras se obtuvo el día 2 del ensayo.

3.1.6. TERAPIA LÁSER (TL)

- Equipo láser

Para llevar a cabo las terapias láser contamos con un láser terapéutico Clase IV. El modelo de equipo empleado fue el K-Cube 4® de la empresa K-Laser (K-Laser®, Treviso, Italia) (Figura 8). Este modelo, con un software desarrollado para uso veterinario, permitió crear y almacenar programas específicos para cada terapia. Al tratarse de un láser Clase IV, el equipo podía aplicar una potencia superior a los 0,5 W, siendo el máximo aplicable los 20 W. Además, este equipo tiene la posibilidad de utilizar una frecuencia de entrega continua (CW), así como pulsada desde 1 hasta 20.000 Hz. En una misma terapia el equipo puede utilizar de uno a diez tipos distintos de frecuencia. K-Laser K-Cube 4® además emplea luz a cuatro longitudes de onda distintas: 660, 800, 905 y 970 nm, gracias a los materiales que forman su medio activo: Diodo Ga-As-Al. Al igual que ocurre con la frecuencia de pulsado, el equipo permite utilizar desde una única longitud de onda hasta las cuatro de manera conjunta en una misma terapia láser. El zoom de la pieza de mano permite concentrar la potencia en un área variable a medida que ésta se aleja del paciente, de modo que se pueda ajustar la densidad de potencia.

Figura 8. Equipo K-Laser K-Cube 4®



Foto cortesía de AVANVET® España.

- **Parámetros de tratamiento**

En este ensayo se decidió emplear una densidad de energía o dosis de 6 y 2 J/cm² para los grupos de ensayo A y B respectivamente. Para el grupo C, se decidió emplear el modo placebo del que disponía el equipo.

El grupo A y B compartieron el resto de parámetros de terapia láser. De esa manera, cada terapia empleó cinco frecuencias distintas: CW, 50, 500, 5.000 y 20.000 Hz. Cada una de ellas se aplicó durante el mismo tiempo. La potencia media (P_a) de irradiación por terapia fue de 2 W. En modo pulsado el equipo trabaja a un ciclo de trabajo del 50%, por lo que la potencia pico (P_p) en modo pulsado fue de 4 W. Todas las terapias láser emplearon las cuatro longitudes de onda de forma simultánea.

Para el grupo C se programó el modo placebo del equipo previo a la elección de una terapia láser. Con esa programación, el equipo entrega luz roja de 5 mW de potencia junto con un sonido similar al emitido durante las terapias normales. Esto permitió a todas las personas que presenciaron la terapia, distintas al investigador principal, creer que se estaba aplicando luz láser, aunque no tuviera relevancia clínica en el ensayo.

Se programaron un total de seis terapias láser, es decir 3 opciones por grupo experimental (A y B) en función del tamaño de la herida. Dos ejemplos del cálculo de una terapia serían:

- Ejemplo Grupo A (6 J/cm^2) con área de irradiación de 25 cm^2

$$\text{Dosis} = \text{Energía} / \text{cm}^2$$

$$6 \text{ J/cm}^2 = \text{Energía} / 25 \text{ cm}^2$$

$$\text{Energía} = 150 \text{ J}$$

Esos 150 J de energía total entregada se repartieron de igual manera por cada una de las cinco frecuencias de pulso. Por lo que:

- En la frecuencia continua (CW) se entregaron 30 J
- En la frecuencia pulsada de 50 Hz se entregaron 30 J
- En la frecuencia pulsada de 500 Hz se entregaron 30 J
- En la frecuencia pulsada de 5.000 Hz se entregaron 30 J
- En la frecuencia pulsada de 20.000 Hz se entregaron 30 J

El tiempo de irradiación por terapia se calculó en base a la potencia media empleada (2 W), así como a la energía total entregada. Por lo que:

$$\text{Energía} = \text{Potencia} \times \text{Tiempo}$$

$$150 \text{ J} = 2 \text{ W} \times \text{Tiempo}$$

$$\text{Tiempo} = 75 \text{ segundos}$$

Al igual que la energía, el tiempo se repartió a partes iguales por cada una de las cinco frecuencias de pulso. De esa manera, cada frecuencia de pulsado contó con 15 segundos de terapia.

- Ejemplo Grupo B (2 J/cm^2) con área de irradiación de 100 cm^2

$$\text{Dosis} = \text{Energía} / \text{cm}^2$$

$$2 \text{ J/cm}^2 = \text{Energía} / 100 \text{ cm}^2$$

$$\text{Energía} = 200 \text{ J}$$

Esos 200 J de energía total entregada se repartieron de igual manera por cada una de las cinco frecuencias de pulso. Por lo que:

- En la frecuencia continua (CW) se entregaron 40 J
- En la frecuencia pulsada de 50 Hz se entregaron 40 J
- En la frecuencia pulsada de 500 Hz se entregaron 40 J
- En la frecuencia pulsada de 5.000 Hz se entregaron 40 J
- En la frecuencia pulsada de 20.000 Hz se entregaron 40 J

El tiempo de irradiación por terapia se calculó en base a la potencia media empleada (2 W), así como a la energía total entregada. Por lo que:

$$\text{Energía} = \text{Potencia} \times \text{Tiempo}$$

$$200 \text{ J} = 2 \text{ W} \times \text{Tiempo}$$

$$\text{Tiempo} = 100 \text{ segundos}$$

Al igual que la energía, el tiempo se repartió a partes iguales por cada una de las cinco frecuencias de pulso. De esa manera, cada frecuencia contó con 20 segundos de terapia.

Para tratar un área de 25 cm², cada fase de pulsado se aplicó durante 15 s hasta obtener 6 J/cm², o durante 5 s para obtener 2 J/cm². Para tratar un área de 50 cm², cada fase de pulsado se aplicó durante 30 s hasta obtener 6 J/cm², o durante 10 s para obtener 2 J/cm². Para tratar un área de 100 cm², cada fase de pulsado se aplicó durante 60 s hasta obtener 6 J/cm², o durante 20 s para obtener 2 J/cm² (Tabla 1).

Tabla 1. Terapias láseres programadas para cada tipo de área y dosis.

Área	Dosis	CW	50 Hz	500 Hz	5K Hz	20K Hz	Total
25 cm ²	6 J/cm ²	30 J (15 s)	30 J (15 s)	30 J (15 s)	30 J (15 s)	30 J (15 s)	150 J (75 s)
	2 J/cm ²	10 J (5s)	10 J (5s)	10 J (5s)	10 J (5s)	10 J (5s)	50 J (25 s)
50 cm ²	6 J/cm ²	60 J (30 s)	60 J (30 s)	60 J (30 s)	60 J (30 s)	60 J (30 s)	300 J (150 s)
	2 J/cm ²	20 J (10 s)	20 J (10 s)	20 J (10 s)	20 J (10 s)	20 J (10 s)	100 J (50 s)
100 cm ²	6 J/cm ²	120 J (60 s)	120 J (60 s)	120 J (60 s)	120 J (60 s)	120 J (60 s)	600 J (300 s)
	2 J/cm ²	40 J (20 s)	40 J (20 s)	40 J (20 s)	40 J (20 s)	40 J (20 s)	200 J (100s)

*CW – frecuencia continua; J – Julios; s – segundos; K – 1000 unidades; Hz - Hercios

Los parámetros de tratamiento para cada grupo se resumen en la siguiente tabla (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de terapia para cada grupo de ensayo.

Grupo	Dosis	Longitud de onda	Frecuencia	Potencia
A	6 J/cm ²	660 nm	CW	2 Pa
		800 nm	50 Hz	
B	2 J/cm ²	905 nm	5000 Hz	4 Pp
		970 nm	20000 Hz	
C	Placebo			

* J – Julios; nm – nanómetros; CW – frecuencia continua; Hz – Hercios; Pa – potencia media; Pp – potencia pico; Placebo – 5 mW con luz roja visible pulsada.

- Aplicación de Terapia Láser

Se aplicaron un total de 3 terapias, de las cuales, tan solo las dos primeras repercutieron directamente en la valoración microbiológica (día 0 y 1), puesto que el segundo muestreo se realizó siempre de manera previa a la aplicación de la TL del día 2.

La manera de aplicar la TL en cada una de las ocasiones fue la misma. Para ello, con el molde de silicona estéril situado sobre el paciente y delimitando el área de muestreo/tratamiento se aplicó la terapia láser correspondiente a su grupo y área de tratamiento. La pieza de mano se posicionó perpendicular a la superficie del paciente y con distancia aproximada de 2 cm entre cabezal y superficie. El zoom del cabezal siempre se encontró abierto lo que permitió irradiar un área de superficie en estático de unos 10 cm². Durante la terapia láser, el dispositivo se movió a lo largo de toda la superficie de tratamiento de forma uniforme.

Todas las terapias láser se llevaron a cabo en la misma sala. Cada persona que presenciaba la terapia, hasta un máximo de tres, utilizaron gafas especiales para proteger sus ojos. Del mismo modo, los ojos de los pacientes se protegieron con gafas especiales facilitadas por la casa comercial del equipo láser.

3.1.7. MANEJO ESTÁNDAR

Como manejo estándar entenderemos aquellos tratamientos, tanto médicos como propios de la herida, que se repitieron de igual manera para cada uno de los pacientes incluidos en el ensayo.

- Tratamiento médico

Todos los pacientes incluidos en el ensayo recibieron una dosis subcutánea de cefovecina (Convenia[®], Zoetis, España), a razón de 8 mg/kg de peso vivo y que presenta catorce días de duración terapéutica. La administración del antibiótico siempre se llevó a cabo después de realizar la terapia láser del día 0 (ver figura 8).

- Manejo de la herida

En todos los pacientes se realizó el lavado de la herida con un suero cristalóide isotónico de Ringer Lactato (Ringer Lactato[®] pH 6,5, Braun, España) a razón de 50 mililitros de suero por cada centímetro de área de herida. Es decir, si una herida presentaba 5 cm², se realizaba el lavado con 250 ml de suero Ringer Lactato. Para el lavado se contó con la ayuda de una manga de infusión (Medpad[®], Riester, España), un sistema de goteo de 20 gotas por mililitro (Henry Schein, España) y de una aguja hipodérmica de 20 G (Microlance[®], DH material médico, España). La manga de infusión

permitió realizar el lavado a una presión constante de 300 mmHg. El extremo de la aguja se posicionó aproximadamente a 5 cm de distancia de la lesión.

Como manejo estándar de la herida se incluyó la colocación de un collar isabelino (Henry Schein, España) en todos los pacientes. Dicho collar imposibilita que el paciente tenga acceso a la herida. De este modo no se retrasa la cicatrización ni se aumenta la carga bacteriana.

Este lavado se llevó a cabo cada día del ensayo y siempre después de la TL (ver figura 7).

3.1.8. MANEJO ADICIONAL

Como manejo adicional entenderemos todos los tratamientos, tanto médicos como propios de la herida, que se realizaron en cada paciente a parte del uso de la cefovecina, el collar isabelino y del lavado de la herida.

- Tratamiento médico

Todos los medicamentos distintos a la cefovecina quedaron recogidos como medicamentos adicionales. Los medicamentos empleados con más frecuencia entre los pacientes que se incluyeron en el estudio fueron:

- Meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, España), 1 mg/kg/día. Administrado por vía subcutánea. Este fármaco se administró vía subcutánea en cada visita durante el tiempo de duración del ensayo.
- Tramadol. (Adolonta®, Cima, España), 2 a 4 mg/kg/8-12 horas. Administrado por vía oral. Este fármaco se recetó para administrar en casa al menos durante el tiempo de duración del ensayo.
- Famotidina (Famotidina Normon®, Normon, S.A., España), 1 a 2 mg/kg/día. Administrado por vía oral. Este fármaco se recetó para administrar en casa al menos durante el tiempo de duración del ensayo.

Los pacientes hospitalizados que recibieron algunos de estos medicamentos el día 0, mantuvieron el tratamiento acorde a las recomendaciones terapéuticas del fármaco en cuestión durante su estancia en el hospital.

- Manejo de la herida

Dentro del manejo adicional de la herida se incluyó la necesidad de colocación de drenajes (Penrose®, PetStyle, España), puntos de sutura (Dafilon®, Braun, España) o vendajes.

En aquellos pacientes, donde las heridas fueron provistas de un vendaje el día 0, los días sucesivos del ensayo se colocó un apósito estéril de algodón (Cosmopor®, Profarma, España) sobre las mismas.

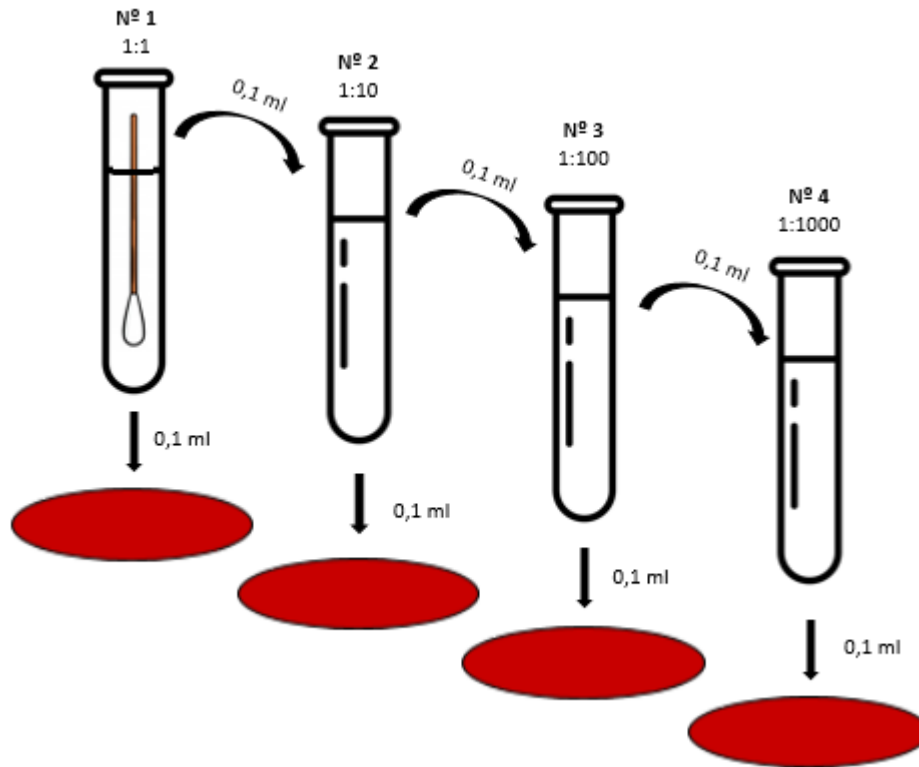
3.1.9. MICROBIOLOGÍA

Las muestras “pre-tratamiento” (día 0) y “post-tratamiento” (día 2) de cada paciente se llevaron al Servicio de Microbiología y Parasitología (Departamento de Sanidad Animal) del Hospital Clínico Veterinario Complutense para su procesado.

Por cada paciente hubo una muestra “pre-tratamiento” y una “post-tratamiento”. El procesado de cada una de ellas fue idéntico.

Partimos del tubo nº 1 de cada una de las muestras, tubo empleado para humedecer el hisopo con el que se tomaron las muestras y recoger la carga bacteriana inicial. Una vez en el laboratorio, se prepararon tres tubos estériles con 0,9 ml de PBS cada uno de ellos por cada paciente y muestra. Cada uno de esos tubos fue numerado del 2 al 4. A partir de 0,1 ml de PBS del tubo nº1 se obtuvo una dilución 1:10 en el tubo 2. Este proceso se repitió de manera escalonada entre los tubos, obteniendo una dilución 1:100 y otra dilución 1:1000 para los tubos 3 y 4 respectivamente. De esa manera, por cada muestra se obtuvieron 4 diluciones “pre-tratamiento” y 4 diluciones “post-tratamiento”. (Figura 9).

- Figura 9. Representación de los tubos de muestras, sus diluciones y la cantidad de muestra para uno de los medios.



Nº 1, 1:1 – Tubo que contiene la muestra recogida con el hisopo de los pacientes, no presenta dilución; Nº 2, 1:10 – tubo que se obtiene a partir de 0,1 ml del tubo Nº 1, presenta una dilución 1:10 con respecto a la muestra inicial; Nº 3, 1:100 – tubo que se obtiene a partir de 0,1 ml del tubo Nº 2, presenta una dilución 1:100 con respecto a la muestra inicial; Nº 4, 1:1000 – tubo que se obtiene a partir de 0,1 ml del tubo Nº 3, presenta una dilución 1:1000 con respecto a la muestra inicial

De cada una de las diluciones se llevó a cabo la siembra en dos medios de cultivo distintos de 0,1 ml por medio. Esa décima parte de mililitro se distribuyó de manera uniforme por la placa de siembra con la ayuda de un asa de Digralsky de un solo uso (Deltalab, España). Los medios de cultivo elegidos para este ensayo fueron:

- Agar Sangre (Agar Columbia® 5% sangre de cordero, Biomerieux, España) (AS).
- Agar MacConkey (Mac Conkey®, Biomerieux, España) (MC).

Todos los medios fueron incubados en una estufa (36L®, Selecta, España) a una temperatura de 37°C durante 72 horas. A las 72 horas se realizó la lectura de todas las unidades formadoras de colonias (UFC) de cada una de las placas. De las cuatro placas

por muestra y tipo de medio, se eligió aquella que presentara entre 30 y 300 UFC. A esta placa se la denominó “placa de lectura”. De esa manera, cada paciente presentaba:

- Una placa de lectura de agar Sangre a partir de la muestra pre-tratamiento. Nombrada AS-Pre.
- Una placa de lectura de agar MacConkey a partir de la muestra pre-tratamiento. Nombrada MC-Pre.
- Una placa de lectura de agar Sangre a partir de la muestra post-tratamiento. Nombrada AS-Post.
- Una placa de lectura de agar MacConkey a partir de la muestra post-tratamiento. Nombrada MC-Post.

Para la obtención del número total de UFC/ml para cada tipo de medio y muestra fue necesario corregir el factor de dilución empleado, multiplicando por el inverso de la dilución de la placa de lectura elegida. De esa manera, 30 UFC de una placa de lectura obtenida a partir de la dilución del tubo nº 2 serían 3000 UFC totales por ml para esa muestra. La carga bacteriana total de cada muestra se dividió por cm^2 de área irradiada/muestreada, por lo que, para el ejemplo anterior, en un área de 25 cm^2 tendríamos una carga bacteriana de 120 UFC/cm^2 .

De las placas AS-Pre y AS-Post se recogió una colonia de cada uno de los distintos tipos morfológicos observados. Cada una de ellas se sembró en AS y se incubó bajo las mismas condiciones de temperatura durante 24 horas.

Se recogió el número de colonias morfológicamente distintas observadas para las placas AS-Pre y AS-Post.

A las 24 horas de incubación se congeló cada tipo morfológico en crioviales (Microkit®, Deltalab, España) a una temperatura de -40°C en un congelador de laboratorio (Fiocchetti, Italia)

Cada una de esas cepas fue identificada en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, empleando la espectrofotometría de masas Matrix-Asisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight

(MALDI-TOF®). Las cepas no identificadas por este sistema, se identificaron de forma presuntiva hasta género mediante la tinción de Gram y pruebas de catalasa y oxidasa.

3.1.10. VALORACIÓN DE HERIDAS

Todas las heridas fueron fotografiadas tras el tratamiento láser de los días 0, 1 y 2. Para cada paciente se realizó una presentación fotográfica de la evolución de las heridas que posteriormente fueron valoradas por dos evaluadores, de forma independiente, que desconocían el paciente al que pertenecía cada fotografía. Ambos evaluadores eran veterinarios con más de 15 años de experiencia en cirugía de tejidos blandos. Se empleó una escala de puntuación de heridas obtenida a partir de una modificación sobre la publicada por Falanga y cols.¹ La modificación consiste en la eliminación de los factores de cronicidad de una herida y en la inclusión de factores como un cultivo bacteriológico positivo/negativo y el síntoma de hematoma. De esa manera, cada herida fue valorada del 2 al 12, siendo 12 la mayor de las puntuaciones posibles para una herida en cuanto a mejor apariencia clínica de la misma.

Tabla 3. Escala modificada de puntuación de heridas a partir de la establecida por Falanga y cols.¹

Parámetro clínico	Puntuación		
	0	1	2
Cantidad de exudado	Severo y/o purulento	Moderado	Ninguno/leve
Edema o hinchazón	Severo	Moderado	Ninguno/leve
Dermatitis alrededor de la herida	Severa	Moderada	Ninguna/leve
Hematoma	Severo	Moderado	Ninguno/leve
Necrosis o tejido potencialmente no viable	>25% de la superficie de la herida	0-25%	Ninguno
Cultivo bacteriológico	Positivo		Negativo

3.1.11. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES

Cada paciente fue revisado en días sucesivos en función de la evolución de sus heridas hasta la cicatrización completa de las mismas. Todos recibieron el alta definitiva en un plazo máximo de 2 semanas. La evolución de cada uno de ellos quedó reflejada en la base de datos informática del hospital.

3.2. ENSAYO *IN-VITRO*

3.2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio experimental en el Servicio de Microbiología y Parasitología (Departamento de Sanidad Animal) del Hospital Clínico Veterinario Complutense.

Uno de los investigadores fue el encargado de llevar a cabo la aplicación de la TL sobre las bacterias. El resto de participantes, desconocedores de la TL aplicada a cada una de las placas, se encargaron del procesado de las muestras microbiológicas y del recuento de colonias llevado a cabo a las 24 horas. Del mismo modo, la persona encargada de realizar el análisis estadístico trató los resultados sin conocer los parámetros de tratamiento de los grupos experimentales a los que pertenecían.

Para llevar a cabo el ensayo se eligieron dos tipos bacterianos: *Staphylococcus intermedius* y *Escherichia coli*. Ambas cepas se extrajeron del cepario del Servicio de Microbiología y Parasitología (Departamento de Sanidad Animal) del Hospital Clínico Veterinario Complutense.

3.2.2. DEFINICIÓN DE VARIABLES

- Variable dependiente

Como variable dependiente se eligió el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por placa de siembra.

- Variables independientes

▪ Terapia láser.

Se aplicaron un total de 5 tipos distintos de terapia láser que se nombraron del 1 al 5 según el número de la placa de irradiación (Tabla 4).

- 1– 2 J/cm²; 3 Wa; 50 Hz.
- 2 – 10 J/cm²; 3 Wa; 50 Hz.
- 3 – 20 J/cm²; 3 Wa; CW.
- 4 – 20 J/cm²; 3 Wa; 50 Hz.
- 5 – Placebo.

▪ Bacteria.

- *Staphylococcus intermedius*.
- *Escherichia coli*.

3.2.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE IRRADIACIÓN

Para la realización del ensayo contamos con placas estériles de poliestireno con tapa de 12 pocillos (4x3) de 5 ml de capacidad cada uno (Falcon®, Thermo Fisher Scientific, España). En cada placa, la primera fila se destinó a la especie *S. intermedius* y la tercera a la *E. coli*. La fila sin usar permitió evitar la transmisión de energía entre ambos grupos.

Las suspensiones bacterianas empleadas en el estudio se prepararon a partir de un criotubo de *Staphylococcus intermedius* y otro de *Escherichia coli* de la crioteca a -40 °C. En cada ocasión se empleó una de las bolas de cerámica porosa que contienen, evitando la descongelación el resto del criotubo. Cada bola se sembró en AS y fue incubada durante 24 horas. A partir del cultivo crecido se preparó una suspensión Escala nº1 de McFarland con PBS estéril. El tubo con turbidez correspondiente al Nº 1 de la Escala de McFarland, con una concentración bacteriana de 3×10^8 UFC/ml, se diluyó

hasta obtener una dilución de 3×10^2 UFC/ml. De esta dilución se emplearon 3 ml para rellenar cada uno de los pocillos de la primera y tercera fila de las cinco placas.

Cada una de las placas se numeró del 1 al 5. Cada una de las placas recibió una terapia láser con unos parámetros de terapia distintos. Una de las placas se destinó al grupo control, recibiendo de este modo una terapia láser placebo idéntica a la realizada en el Grupo C del ensayo *in-vivo*. Se eligieron como dosis de terapia 2, 10 y 20 J/cm², repitiendo esta última dosis en dos de los grupos. La potencia permaneció constante entre los grupos (3 Wa). Por su parte, se empleó dos tipos distintos de frecuencia: una frecuencia continua (CW) para uno de los grupos y una frecuencia pulsada de 50 Hz, para los tres restantes (Tabla 4). Todas las terapias láser, menos la terapia placebo, utilizaron las cuatro longitudes de onda empleadas también en el ensayo *in-vivo* (660, 800, 905 y 970 nm).

Tabla 4. Parámetros de terapia láser para cada uno de los 5 grupos del ensayo *in-vitro*.

Placa	Parámetros de TL
1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz
2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz
3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW
4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz
5	Placebo

* TL – Terapia láser; J – Julios; Wa – potencia media; Hz – Hercios.

Para descartar un posible efecto foto-térmico secundario a la densidad de potencia empleada (0,7 W/cm²), se realizó una medición de temperatura en un pocillo control para cada uno de los grupos experimentales con la ayuda de una sonda de inmersión para medición de temperaturas (Temp 7 PT100 Basic®, Genesys Instrumentation).

3.2.4. APLICACIÓN DE LA TERAPIA LÁSER

Se aplicó cada uno de los protocolos de terapia a cada uno de los pocillos que componían cada placa. Para ello, se posicionó de manera perpendicular al pocillo la pieza de mano y se colocó a una distancia en la cual el haz de luz, con el zoom abierto por completo, abarcara toda la circunferencia del pocillo. El tiempo de terapia para cada pocillo varió en función de los parámetros empleados.

3.2.5. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Una vez terminada la terapia láser se utilizó 0,1 ml de cada uno de los pocillos como inóculo y se sembró en AS. Dichos cultivos fueron incubados bajo condiciones de aerobiosis en una estufa a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se llevó a cabo la lectura de cada una de las placas.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO *IN-VIVO*

- Aleatorización

Para la inclusión de los pacientes en cada uno de los grupos del ensayo se utilizó el programa informático estadístico Stata 13.1 (Stata Crop.®, College Station, TX, USA). Debido a que la muestra fue pequeña existió la posibilidad de que la aleatorización no funcionara por lo que se actuó con los desequilibrios con el análisis multivariable.

- Análisis descriptivo

Las variables cualitativas se presentaron con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumieron en su media, desviación estándar (DE). En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y en caso de asimetría se calcularon la mediana y su rango intercuartil (RIC).

Para analizar la influencia de las diferentes variables independientes sobre la variable dependiente se realizó un modelo de regresión lineal multivariable. Las variables con una $p < 0,100$ o que se consideraron clínicamente relevantes en el análisis

de regresión lineal univariable se incluyeron en el análisis de regresión lineal multivariable. El modelo final fue construido mediante la técnica de eliminación por pasos hacia delante y hacia atrás (*Stepwise regression* y *backward regression*). El valor de significancia por el que se optó para el método de eliminación hacia delante fue de $p < 0,050$, mientras que el de las variables eliminadas para el método de eliminación hacia atrás fue de $p < 0,100$.

Los resultados se muestran como el ratio de la media estimada para cada variable. En las variables cuantitativas, este ratio expresa el incremento relativo de la media por cada unidad incrementada en la variable independiente. En variables cuantitativas (grupos) el ratio expresó el aumento medio en el LN de la UFC de los pacientes tratados en el grupo A y B tomando como referencia aquellos utilizados en el grupo C. La razón de medias se obtuvo mediante exponentación de la base e del coeficiente del modelo de regresión lineal (β).

Para evaluar la concordancia entre los observadores con respecto a la variable puntuación de la herida se compararon las diferencias de puntuación y se obtuvo un 87,7% de acuerdo donde la diferencia de puntuación no fue mayor de 2. Por lo que la medida de resultado final es la media de la puntuación de ambos observadores.

Para evaluar la diferencia entre medias de puntuación entre grupos entre el día 0 y 2 se realizó mediante un test ANCOVA (análisis de la covarianza). Como referencia se tomó el grupo C (grupo control), ajustado a sus valores en el día 0 y con los intervalos de confianza.

3.3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO *IN-VITRO*

Para analizar la influencia de la variable independiente, terapia láser, sobre la variable dependiente LN de las unidades formadoras de colonias se realizó un modelo de regresión lineal.

Los resultados se muestran como el ratio de la media estimada para cada variable. Las variables cuantitativas (grupos), el ratio expresa el aumento medio del LN de las UFC en los diferentes pocillos a los que se les aplicó el láser con diferentes energías

y potencias en relación a una de ellas. El ratio se obtuvo mediante exponentación de la base e del coeficiente del modelo de regresión lineal (β).

Para ambos ensayos, en todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05. En el caso de comparaciones múltiples se utilizó el ajuste de Bonferroni.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS versión 20.0 (SPSS® Statistic 20.0, IBM, EE.UU.) y Stata versión 13.1.

4. RESULTADOS

4.1. ENSAYO *IN-VIVO*

4.1.1. VARIABLES CLÍNICAS GENERALES

Durante el estudio piloto no se recibió ningún paciente que cumpliera los criterios de inclusión, y que a su vez presentara alguno de los de exclusión. Por el contrario, dos pacientes (12,5% - 2/16), que cumplían los criterios de inclusión y no presentaban ninguno de exclusión, no fueron incluidos en el ensayo por decisión de sus propietarios. Uno de ellos no formó parte del ensayo por razones económicas, mientras que el otro por dificultad a la hora de asistir a las revisiones de los días 1 y 2 del ensayo.

Finalmente, catorce pacientes (87,5% - 14/16) fueron incluidos en el estudio. Cuatro pacientes (28,6% - 4/14) fueron asignados de manera aleatoria al Grupo A, mientras que el Grupo B y C contaba con cinco pacientes (35,7% - 5/14) cada uno (Tabla 5).

Tabla 5. Número de pacientes por grupo de ensayo.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Total
Nº de pacientes	4	5	5	14

* Grupo A – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo.

Dentro del Grupo A se incluyó un 25% (1/4) machos y un 75% (3/4) hembras. El 100% (1/1) de los machos incluidos en el Grupo A no estaban castrados. El 66,6% (2/3) de las hembras incluidas en el Grupo A no estaban castradas y el 33,3% (1/3) castradas. La mediana de edad en el Grupo A fue de 4,5 años (RIQ: 0,3-8,0 años) y el peso mediano fue de 9,5 kg (RIQ: 3,0-15,0 kg).

El Grupo B incluía un 20% (1/5) de machos y un 80% (4/5) hembras. El 100% (1/1) de los machos no estaban castrados y el 100% (4/4) de las hembras estaban castradas. La mediana de edad para los pacientes incluidos en el Grupo B fue de 7 años (RIQ: 3-10 años) y el peso mediano fue de 15,0 kg (RIQ: 7,8-23,0 kg).

Por su parte, el Grupo C incluyó un 40% (2/5) de pacientes machos y un 60% (3/5) hembras. El 100% de los machos (2/2) y hembras (3/3) estaban castrados. La mediana de edad de los pacientes pertenecientes a este grupo fue de 7,6 años (RIQ: 4,0-13,0 años). El peso mediano fue de 23,5 kg (RIQ: 19,8-32,0 kg).

La distribución de los pacientes según el sexo, estado reproductor, edad y peso en cada grupo se resume en la tabla 6.

Tabla 6. Distribución de frecuencias en función de las variables clínicas de género, estado reproductor, edad y peso en cada grupo de ensayo.

Variable	Grupo A n/N (%)	Grupo B n/N (%)	Grupo C n/N (%)
Género			
Macho	1/4 (25%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)
Hembra	3/4 (75%)	4/5 (80%)	3/5 (60%)
Estado reproductor			
No castrado	3/4 (75%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
Castrado	1/4 (25%)	4/5 (80%)	5/5 (100%)
Edad (años)	4,5 (0,3-8,8)*	7 (3-10)*	7,6 (4,0-13,0)*
Peso (kg)	9,5 (3,0-15,0)*	15,0 (7,8-23,0)*	23,5 (19,8-32,0)*

*mediana (percentil 25-75); Grupo A – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo.

En el estudio se recogieron un total de 8 razas, incluyendo los perros de raza mestiza. Dicha raza, fue la que apareció con más frecuencia en el estudio (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución de frecuencias según la raza en cada grupo de ensayo.

Variable	Grupo A n/N (%)	Grupo B n/N (%)	Grupo C n/N (%)
Raza			
Galgo	0/4 (0%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)
Jack Russell Terrier	2/4 (50%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Perdiguero de Burgos	1/4 (25%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Jagd Terrier	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
Pastor Alemán	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)
Podenco	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)
Bodeguero Andaluz	1/4 (25%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Mestizo	0/5 (0%)	3/5 (60%)	1/5 (20%)

Grupo A – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo.

4.1.2. VARIABLES ESPECÍFICAS DE LA HERIDA

Un paciente de cada grupo presentó más de una herida (21,4% (3/14) del total de pacientes). El paciente perteneciente al Grupo A presentaba 2 heridas, mientras que los pacientes del Grupo B y C presentaron 3 y 4 heridas respectivamente. El 79,6% (11/14) de los pacientes restantes presentaron tan solo una herida. En el 100% (14/14) de los pacientes tan sólo se incluyó una de las heridas en el estudio.

En el Grupo A el 75% (3/4) de los pacientes presentaron heridas por mordedura de otros perros y el 25% (1/4) por una causa accidental. En el Grupo B y C, el 60% (3/5) de los pacientes presentaron heridas traumáticas secundarias al ataque de otro perro y el 40% (2/5) restante por otra causa.

El 75% (3/4) de las heridas de los pacientes del Grupo A se distribuyeron en las extremidades, mientras que el 25% (1/4) restante se distribuyó en el tronco. Para los pacientes del Grupo B, la distribución de las heridas fue del 60% (3/5) en el tronco y el 40% (2/5) en las extremidades. Tan sólo un 20% (1/5) de las heridas se distribuyó en el tronco frente al 80% (4/5) en las extremidades en los pacientes del Grupo C (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de frecuencias según las variables específicas de la/s herida/s en cada grupo de ensayo.

Variable	Grupo A n/N (%)	Grupo B n/N (%)	Grupo C n/N (%)
Nº de heridas			
1	3/4 (75%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)
>1	1/4 (25%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)
Etiología			
Mordisco	3/4 (75%)	3/5 (60%)	3/5 (60%)
Accidental	1/4 (25%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)
Localización			
Tronco	1/4 (25%)	3/5 (60%)	1/5 (20%)
Extremidad	3/4 (75%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)

Grupo A – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo.

El área mediana de las heridas de los pacientes del Grupo A fue de 7,7 cm² (RIQ: 0,2-21,0 cm²). Esa misma variable para los pacientes del Grupo B y C fue de 3,6 cm² (RIQ: 0,4-8,0 cm²) y 4,9 cm² (RIQ: 0,2-13,5 cm²) respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Mediana del área de las heridas incluidas en cada grupo de ensayo.

Variable	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Área herida (cm ²)	7,7 (0,2-21,0)*	3,6 (0,4-8,0)*	4,9 (0,2-13,5)*

* Mediana (percentil 25-75); Grupo A – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo.

4.1.3. VARIABLES ESPECÍFICAS DEL TRATAMIENTO

Todos los pacientes recibieron el tratamiento médico y manejo de la herida estandarizado para el presente ensayo. Ningún paciente del estudio tuvo que recibir un tratamiento adicional con otro antibiótico. El 100% (4/4) de los pacientes del Grupo A recibieron durante el ensayo clínico meloxicam como terapia antiinflamatoria junto con famotidina. Ninguno de los pacientes del Grupo A recibió terapia analgésica. En el Grupo B, el 80% (4/5) de los pacientes recibió meloxicam junto famotidina, el 20% (1/5)

restante no. Ningún paciente perteneciente al Grupo B recibió terapia analgésica. El 100% (5/5) de los pacientes del Grupo C recibieron meloxicam junto con la famotidina durante el ensayo. Además, el 40% (2/5) de los pacientes del Grupo C fue tratado con tramadol.

En el Grupo A, el 50% (2/4) de los pacientes requirió sedación el día 0 del ensayo. El 100% (4/4) de los pacientes sedados en el Grupo A recibieron puntos de sutura, y el 50% (2/4) además requirió la colocación de un drenaje. Ningún paciente del Grupo A necesitó vendaje. En los pacientes del Grupo B, el 60% (3/5) se manejaron el día 0 bajo sedación. En ninguno de estos pacientes se colocó drenaje, pero el 66,6% (2/3) si requirió puntos de sutura. Además, un 20% (1/5) de los pacientes del Grupo B necesitó la colocación de un vendaje protector. Por último, el 100% (5/5) de los pacientes del Grupo C fue sedado el día 0 para la colocación de puntos de sutura. Ninguno de estos pacientes necesitó drenajes, pero el 40% (2/5) si precisó de un vendaje. Ninguno de los pacientes del ensayo fue sedado en los días sucesivos del estudio (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución de frecuencias según las variables específicas del tratamiento para cada grupo de ensayo.

Variable	Grupo A n/N (%)	Grupo B n/N (%)	Grupo C n/N (%)
Cefovecina (Sí/No)	4/4 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Lavado (Sí/No)	4/4 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Tratamiento médico adicional			
Antibiótico (Sí/No)	0/4 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Meloxicam (Sí/No)	4/4 (100%)	4/5 (80%)	5/5 (100%)
Tramadol (Sí/No)	0/4 (0%)	0/5 (0%)	2/5 (40%)
Famotidina(Sí/No)	4/4 (100%)	4/5 (80%)	5/5 (100%)
Sedación (Sí/No)	2/4 (50%)	3/5 (60%)	5/5 (100%)
Manejo adicional de la herida			
Puntos de sutura (Sí/No)	2/4 (50%)	2/5 (40%)	5/5 (100%)
Drenaje (Sí/No)	1/4 (25%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Vendaje(Sí/No)	0/4 (0%)	1/5 (25%)	2/5 (40%)

* Grupo A – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo.

Un paciente de cada grupo presentaba una patología conocida por la que se medicaba en el momento de inclusión en el estudio. Además, un 20% de los pacientes del Grupo B y C necesitaron hospitalización durante al menos las primeras 24 horas del ensayo. En ninguno de los casos su estancia se prolongó más allá del tiempo del estudio (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de frecuencias según la presencia de enfermedad concomitante y hospitalización en cada grupo de ensayo.

Variable	Grupo A n/N (%)	Grupo B n/N (%)	Grupo C n/N (%)
Patología conocida (Sí/No)	1/4 (25%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)
Hospitalización (Sí/No)	0/4 (0%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)

* Grupo A – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo.

En el Grupo A, el área de muestreo y tratamiento fue de 25 cm² para el 75% (3/4) de los pacientes, y de 100 cm² para el 25% (1/4) restante. En el Grupo B, el 40% (2/5) de los pacientes presentó un área de tratamiento y muestreo de 50 cm² y el 60% (3/5) de 25 cm². Por último, el Grupo C presentó un 40% (2/5) de pacientes con áreas de tratamiento y muestreo de 100 cm² y un 60% (3/5) de 25 cm². (Tabla 12)

Tabla 12. Distribución de la frecuencia según el área de tratamiento/muestreo en cada grupo de ensayo.

Variable	Grupo A n/N (%)	Grupo B n/N (%)	Grupo C n/N (%)
Área tratamiento/muestreo			
100 cm ²	1/4 (25%)	0/5 (0%)	2/5 (40%)
50 cm ²	0/4 (0%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)
25 cm ²	3/4 (25%)	3/5 (60%)	3/5 (60%)

* Grupo A – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo.

4.1.4. VARIABLES MICROBIOLÓGICAS

En la tabla 13 se puede observar el número de UFC para los cultivos AS-Pre, AS-Post, MC-Pre y MC-Post en cada paciente. En uno de los pacientes (nº 7) fue necesario realizar una dilución mayor para la muestra pre-tratamiento por presentar más de 300 UFC en la placa de siembra del tubo nº 4.

Tabla 13. Unidades formadoras de colonias para cada cultivo y tipo de cultivo en cada paciente.

Paciente	TL	UFC AS-Pre	UFC AS-Post	UFC MC-Pre	UFC MC-Post
1	C	172×10^2	121×10	0	6×10
2	A	26×10^4	28×10^4	0	0
3	B	55×10^2	28×10^2	4×10	0
4	A	192×10^3	7×10	0	0
5	B	34×10^4	55×10	46×10^2	0
6	C	30×10^4	84×10^2	58×10^2	3×10
7	C	140×10^5	135×10^3	0	2×10
8	A	21×10^3	37×10	0	0
9	B	11×10^3	43×10^3	0	3×10
10	B	206×10^3	10	0	0
11	A	31×10^4	57×10^2	15×10	4×10
12	C	66×10^2	56×10	0	10
13	C	32×10	92×10	0	0
14	B	5×10^3	66×10^2	0	0

TL – Terapia láser; A – Terapia láser con una dosis de 6 J/cm^2 ; B – Terapia láser con una dosis de 2 J/cm^2 ; C – Terapia láser placebo. UFC ASpre – Unidades formadoras de colina en el cultivo de agar Sangre pre-tratamiento; UFC AS-Post – Unidades formadoras de colina en el cultivo de agar Sangre post-tratamiento; UFC MC-Pre – Unidades formadoras de colonia en el cultivo de agar MacConkey pre-tratamiento; UFC MC-Post – Unidades formadoras de colonia en los cultivos de agar MacConkey post-tratamiento.

En la siguiente tabla, se observa las UFC por centímetro cuadrado de área muestreada y tratada en cada paciente para los cultivos AS y MC pre- y post-tratamiento (Tabla 14).

Tabla 14. Unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado de área de tratamiento/muestreo para cada cultivo y tipo de cultivo en cada paciente.

Paciente	TL	Área tratamiento y muestreo	UFC/cm ²	UFC/cm ²	UFC/cm ²	UFC/cm ²
			AS-Pre	AS-Post	MC-Pre	MC-Post
1	C	100	172	12,1	0	0,6
2	A	100	26 x 10 ²	28 x 10 ²	0	0
3	B	25	220	112	1,6	0
4	A	25	7680	2,8	0	0
5	B	50	68 x 10 ²	11	92	0
6	C	100	3 x 10 ³	84	58	0,3
7	C	25	56 x 10 ⁴	54 x 10 ²	0	0,8
8	A	25	840	14,8	0	0
9	B	25	440	1720	0	1,2
10	B	25	8240	0,4	0	0
11	A	25	124 x 10 ²	228	6	1,6
12	C	25	264	22,4	0	0,4
13	C	25	12,8	36,8	0	0
14	B	50	100	132	0	0

TL – Terapia láser; A – Terapia láser con una dosis de 6 J/cm²; B – Terapia láser con una dosis de 2 J/cm²; C – Terapia láser placebo. UFC/cm² AS-Pre – Unidades formadoras de colina por centímetro cuadrado en el cultivo de agar Sangre pre-tratamiento; UFC/cm² AS-Post – Unidades formadoras de colina por centímetro cuadrado en el cultivo de agar Sangre post-tratamiento; UFC/cm² MC-Pre – Unidades formadoras de colonia por centímetro cuadrado en el cultivo de agar MacConkey pre-tratamiento; UFC/cm² MC-Post – Unidades formadoras de colonia por centímetro cuadrado en los cultivos de agar MacConkey post-tratamiento.

En la tabla número 15, se puede observar el número de colonias morfológicamente distintas observadas para cada paciente en los cultivos AS pre- y post-tratamiento.

Tabla 15. Número de colonias morfológicamente distintas observadas en los cultivos de agar Sangre pre-tratamiento y post-tratamiento en cada paciente.

Paciente	Nº Col.pre	Nº Col.post
1	3	5
2	3	1
3	3	3
4	2	3
5	3	5
6	2	2
7	3	2
8	2	2
9	4	1
10	4	0
11	3	4
12	4	3
13	3	1
14	3	3

Nº Col.pre – Número de colonias morfológicamente distintas en el cultivo de agar Sangre pre-tratamiento; Nº Col.post – Número de colonias morfológicamente distintas en el cultivo de agar Sangre post-tratamiento.

El número de horas que transcurrieron entre la toma de la muestra pre-tratamiento y post-tratamiento se puede observar en la tabla 16.

Tabla 16. Número de horas entre la toma de la muestra del cultivo pre-tratamiento y post-tratamiento en cada paciente.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Horas (h)	44,75	50	47,75	45	48	46	46	45,5	48,5	46,5	44,5	47	47	46,5

4.1.5. ANÁLISIS UNIVARIABLE

Con respecto a las variables clínicas generales se produjo un incremento de la media de colonias observadas a las 72 horas en agar Sangre por cada año de edad, el sexo (Macho/Hembra) y en aquellos pacientes con un peso superior a los 20 kg. Ninguno de los resultados fue significativo. Tan solo el estado reproductor tuvo un resultado

cercano a la significancia estadística mostrando un aumento relativo de la media de colonias a las 72 horas en agar Sangre de los pacientes no castrados en comparación con los que no lo estaban (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar Sangre para las variables clínicas generales de los pacientes.

Agar Sangre	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
Edad	0,248	1,28	-0,307	0,726	0,885
Sexo (Macho/Hembra)	0,279	1,32	-1,843	5,014	0,334
Estado reproductor (No castrado/Castrado)	0,514	1,67	-0,141	5,983	0,060
Peso (≤ 20 Kg/ >20 Kg)	0,025	1,03	-3,772	4,088	0,932

Estas mismas variables mostraron un incremento relativo de la media de las colonias observadas a las 72 horas en agar MacConkey con respecto a cada año de edad y un decremento relativo de la media de colonias para el resto de variables (sexo, estado reproductor y peso). Ninguno de los resultados fue significativo (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar MacConkey de las variables clínicas generales.

Agar MacConkey	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
Edad (años)	0,383	1,47	-0,003	0,015	0,176
Sexo (Macho/Hembra)	-0,282	0,75	-0,092	0,034	0,328
Estado reproductor (No castrado/Castrado)	-0,051	0,95	-0,071	0,060	0,861
Peso (≤ 20 Kg/ >20 Kg)	-0,259	0,77	-0,100	0,040	0,370

La variable correspondiente a la raza no fue incluida dentro del análisis univariable de las variables clínicas generales debido a la diversidad de razas obtenidas y al reducido tamaño muestral.

En lo que se refiere a las variables específicas de las heridas se observó un incremento relativo de la media del número de colonias observadas a las 72 horas en agar Sangre para la variable correspondiente al número de heridas ($1/>1$). Tanto la etiología (Mordisco/Accidental) como la localización de la herida (Tronco/Extremidad)

supone un decremento relativo de la media de colonias a las 72 horas en agar Sangre. Ninguno de los resultados fue significativo (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar Sangre de las variables específicas de las heridas.

Agar Sangre	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
Nº de heridas (1/>1)	0,188	1,21	-2,688	5,035	0,520
Etiología (Mordisco/Accidental)	-0,078	0,92	-2,885	2,247	0,791
Localización (Tronco/Extremidad)	-0,253	0,78	-4,613	1,900	0,382

Los resultados obtenidos para los cultivos en agar MacConkey para las variables específicas de las heridas (nº de heridas, etiología y localización) muestran un decremento relativo de la media del número de colonias a las 72 horas, aunque estos resultados no son estadísticamente significativos (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar MacConkey para las variables específicas de las heridas.

Agar MacConkey	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
Nº de heridas (1/>1)	-0,153	0,86	-0,089	0,054	0,601
Etiología (Mordisco/Accidental)	-0,397	0,67	0,073	0,014	0,160
Localización (Tronco/Extremidad)	-0,017	0,98	-0,064	0,060	0,955

En cuanto a las variables específicas al tratamiento se observó un incremento relativo de la media de las colonias a las 72 horas para los cultivos en agar Sangre con el uso de meloxicam (Sí/No), tramadol (Sí/No) y vendaje (Sí/No), y por la presencia de una enfermedad concurrente (Sí/No) y su consiguiente medicación (tratamiento actual Sí/No). Ninguno de estos valores fue estadísticamente significativo. Por otro lado, se observó un decremento relativo de la media del número de colonias a las 72 horas para las variables de terapia láser (Grupo A y B), sedación (Sí/No), drenaje (Sí/No), sutura (Sí/No) y hospitalización (Sí/No). Del mismo modo que las variables que mostraron un incremento, los resultados de éstas no fueron significativos (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar Sangre para las variables específicas del tratamiento.

Agar Sangre	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
Terapia Láser					
Grupo A (6 J/cm²)	-0,034	0,97	-4,430	4,046	0,922
Grupo B (2 J/cm²)	-0,138	0,87	-4,736	3,256	0,691
Meloxicam (Sí/No)	0,064	1,07	-5,614	6,887	0,828
Tramadol (Sí/No)	0,106	1,11	-3,808	5,360	0,719
Sedación (Sí/No)	-0,038	0,96	-3,784	3,352	0,897
Sutura (Sí/No)	-0,329	0,72	-4,940	1,418	0,251
Drenaje (Sí/No)	-0,412	0,66	-9,810	1,604	0,143
Vendaje (Sí/No)	0,447	1,56	-0,724	6,310	0,109
Enfermedad concurrente (Sí/No)	0,037	1,04	-3,700	4,157	0,901
Tratamiento actual (Sí/No)	0,037	1,04	-3,700	4,157	0,901
Hospitalización (Sí/No)	-0,135	0,87	-4,740	3,050	0,645

Para los cultivos en agar MacConkey, las variables drenaje (Sí/No), vendaje (Sí/No), enfermedad concurrente (Sí/No) y tratamiento actual (Sí/No) mostraron un incremento relativo de la media del número de colonias a las 72 horas. El resto de variables (Terapia láser Grupo A y B, meloxicam (Sí/No), tramadol (Sí/No), sedación (Sí/No), sutura (Sí/No) y hospitalización (Sí/No)) mostraron un decremento relativo de la media del número de colonias a las 72 horas. Ninguna de las variables relativas al tratamiento mostró resultados estadísticamente significativos para los cultivos en agar MacConkey (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar MacConkey para las variables específicas del tratamiento.

Agar MacConkey	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
Terapia Láser					
Grupo A (6 J/cm²)	-0,035	0,97	-0,081	0,074	0,918
Grupo B (2 J/cm²)	-0,184	0,83	-0,091	0,055	0,595
Meloxicam (Sí/No)	-0,196	0,82	-0,149	0,077	0,502
Tramadol (Sí/No)	-0,092	0,91	-0,097	0,072	0,754
Sedación (Sí/No)	-0,066	0,94	-0,072	0,059	0,822
Sutura (Sí/No)	-0,168	0,85	-0,077	0,045	0,567
Drenaje (Sí/No)	0,196	1,22	-0,077	0,149	0,502
Vendaje (Sí/No)	0,224	1,25	-0,045	0,096	0,442
Enfermedad concurrente (Sí/No)	0,259	1,30	-0,040	0,100	0,370
Tratamiento actual(Sí/No)	0,259	1,30	-0,040	0,100	0,370
Hospitalización (Sí/No)	-0,374	0,69	-0,110	0,024	0,187

El análisis univariable de las variables microbiológicas (UFC pre-tratamiento y sumatorio de horas) para los cultivos de agar Sangre mostraron un incremento relativo de la media del número de colonias a las 72 horas, este resultado fue estadísticamente significativo para la variable sumatorio de horas (Tabla 23).

Tabla 23. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar Sangre para las variables microbiológicas.

Agar Sangre	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	P
UFC pre-tratamiento	0,205	1,23	-0,383	0,765	0,483
Sumatorio de horas	0,624	1,87	0,204	1,710	0,017*

* Resultado estadísticamente significativo; UFC pre-tratamiento – Unidades formadoras de colonias en los cultivos de agar Sangre pre-tratamiento; Sumatorio de horas – número de horas entre la toma de muestras del día 0 y 2 para los cultivos en agar Sangre.

A diferencia de lo observado en los cultivos de agar Sangre, las variables microbiológicas para los cultivos en agar MacConkey mostraron un decremento relativo no significativo de la media del número de colonias a las 72 horas (Tabla 24).

Tabla 24. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar MacConkey para las variables microbiológicas.

Agar MacConkey	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	P
UFC pre-tratamiento	-0,072	0,93	-0,045	0,035	0,806
Sumatorio de horas	-0,150	0,86	-0,022	0,013	0,608

UFC pre-tratamiento – Unidades formadoras de colonias en los cultivos de agar MacConkey pre-tratamiento;

Sumatorio de horas – número de horas entre la toma de muestras del día 0 y 2 para los cultivos en agar MacConkey.

Las variables: número de colonias morfológicamente distintas de los cultivos previos a cualquier tratamiento y número de colonias morfológicamente distintas de los cultivos posteriores al tratamiento, para cada paciente, fueron incluidas en el análisis descriptivo, pero no en el análisis univariable debido a la disparidad de resultados obtenidos y al reducido tamaño muestral.

4.1.6. ANÁLISIS MULTIVARIABLE

Las variables incluidas en el modelo multivariable fueron: UFC pre-tratamiento, sumatorio de horas y los tres tipos de terapia láser (Grupo A, B y C).

El análisis multivariable para los cultivos en agar Sangre mostró un incremento relativo de la media del LN del número de colonias a las 72 horas para las variables UFC pre-tratamiento y sumatorio de horas, ambos resultados fueron estadísticamente significativos ($\beta = 0,38$, IC95% 0,07-0,70; $p=0,018$ y $\beta = 1,33$, IC95% 0,80-1,85; $p<0,001$, respectivamente). Por otra parte, se observó un decremento relativo del 79% y 93% en la media del LN del número de colonias a las 72 horas para el Grupo A y B respectivamente con respecto al grupo control, siendo un valor estadísticamente significativo para el Grupo B ($\beta = -2,73$, IC95% -4,36 - [-]1,09; $p=0,001$) (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis multivariantes con respecto a las UFC a las 72 horas para los cultivos en agar Sangre para las variables UFC AS-Pre, sumatorio de horas y terapias láser.

	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
UFC AS-Pre	0,38	1,47	0,07	0,70	0,018*
Sumatorio de horas	1,33	3,76	0,80	1,85	<0,001*
Láser					
Group C (Placebo)	1				
Group A (6 J/cm ²)	-1,55	0,21	-3,91	0,82	0,210
Group B (2 J/cm ²)	-2,73	0,07	-4,36	-1,09	0,001*

* Resultado estadísticamente significativo; UFC AS-Pre – Unidades formadoras de colonias en los cultivos de agar Sangre pre-tratamiento; Sumatorio de horas – número de horas entre la toma de muestras del día 0 y 2 para los cultivos en agar Sangre.

Por otro lado, para los cultivos en agar MacConkey se observó un decremento relativo de la media del número de colonias a las 72 horas para todas sus variables (UFC pre-tratamiento, sumatorio de horas, terapia láser Grupo A y terapia láser Grupo B). Estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 26).

Tabla 26. Análisis multivariable con respecto a las UFC a las 72 horas para los cultivos en agar MacConkey y para las variables UFC MC-Pre, sumatorio de horas y terapias láser.

	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
UFC MC-Pre	-0,003	1,00	-0,051	0,045	0,886
Sumatorio de horas	-0,003	1,00	-0,025	0,019	0,780
Láser					
Group C (Placebo)	1				
Group A (6 J/cm ²)	-0,003	1,00	-0,092	0,086	0,939
Group B (2 J/cm ²)	-0,014	0,99	-0,102	0,074	0,731

UFC MC-Pre – Unidades formadoras de colonias en los cultivos de agar MacConkey pre-tratamiento; Sumatorio de horas – número de horas entre la toma de muestras del día 0 y 2 para los cultivos en agar MacConkey.

4.1.7. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Se obtuvieron un total de 77 cepas entre los catorce pacientes. En el proceso de congelación se perdió un 10,4% (8/77) de las cepas y del 89,6% (69/77) restante, tan solo el 71,4% (14/69) pudieron ser identificadas mediante espectrofotometría de masas. A continuación, se resumen en la tabla 27 la identificación obtenida en cada uno de los pacientes para cada uno de los cultivos en AS realizados (pre- y post-tratamiento).

Tabla 27. Identificación bacteriana de las cepas aisladas en los cultivos de agar Sangre pre- y post-tratamiento para cada paciente.

Paciente	Cepas pre-tratamiento	Cepas post-tratamiento
1	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Escherichia coli*</i>
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Staphylococcus pseudointermedius*</i>
		<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>
2	<i>Aerococcus viridians</i>	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>	
	<i>Neisseria weaveri</i>	
3	<i>Rothia nasimurium</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>	--
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
4	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
5	<i>Micrococcus spp.</i>	--
	<i>Streptococcus spp.</i>	--
	<i>Rothia nasimurium</i>	<i>Actinobacter baumannii</i>
		<i>Kocuria rhizophila</i>
		<i>Micrococcus luteus</i>
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>
	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
7	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	--
	<i>Pasteurella canis</i>	
8	<i>Neisseria canis</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
	<i>Neisseria flavescens</i>	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>

Tabla 27 continuación. Identificación bacteriana de las cepas aisladas en los cultivos de agar Sangre pre- y post-tratamiento para cada paciente.

Paciente	Cepas pre-tratamiento	Cepas post-tratamiento
9	<i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Micrococcus</i> spp.	
	<i>Acinetobacter</i> spp.	
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>	
10	<i>Neisseria weaveri</i>	
	<i>Bergeyella zoohelcum</i>	
	<i>Streptococcus hyointestinalis</i>	
	--	
11	<i>Actinobacter</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus delphini</i>
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
		<i>Streptococcus salivarius</i>
12	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
	<i>Corynebacterium afermentans</i>	<i>Artrobacter</i> spp.
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	--
	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	
13	--	<i>Staphylococcus</i> spp.
	<i>Acinetobacter</i> spp.	
	--	
14	<i>Bergeyella zoohelcum</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.
	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.

*Cepas del mismo género con morfología diferente en el mismo cultivo; -- cepas no identificadas.

En uno de los pacientes, la identificación bacteriana de dos de sus cepas en el segundo cultivo de estudio se repitió (paciente 1). Por ello, se descartaron las cepas repetidas obteniendo un total de 67 cepas distintas aisladas en el estudio.

De las 67 cepas identificadas, hubo un predominio de bacterias gram positivas (71,65 %; 48/67) frente a gram negativas (28,35 %; 19/67). Se aislaron un total de 17 géneros bacterianos siendo el más representado el género *Staphylococcus* spp., con un

32,8% (22/67) del total de cepas identificadas, seguido por *Neisseria* spp. (16,4%; 11/67), *Actinetobacter* spp. (10,4%; 7/67) y *Streptococcus* spp. (7,4%; 5/67). Los 13 géneros restantes contabilizaron un 33% (22/67) del total de bacterias identificadas, presentando cada uno de ellos entre un 1,4 y 4,4%.

4.1.8. VALORACIÓN VISUAL DE LAS HERIDAS

Las valoraciones de las heridas de cada paciente por cada día de ensayo fueron llevadas a cabo por los evaluadores a partir de la escala modificada de Falanga y cols.¹ donde 12 puntos representó la mayor de las puntuaciones para identificar una herida con la mejor apariencia clínica posible (tabla 28).

Tabla 28. Evaluación de las heridas por los evaluadores por paciente y día de ensayo.

Paciente	TL	Evaluador 1			Evaluador 2		
		Día 0	Día 1	Día 2	Día 0	Día 1	Día 2
1	C	6	10	10	6	6	7
2	A	8	8	8	6	7	7
3	B	9	10	10	7	8	9
4	A	7	8	9	5	7	7
5	B	7	9	10	5	8	10
6	C	7	10	10	6	8	8
7	C	8	9	9	5	7	7
8	A	7	9	9	6	8	8
9	B	10	10	10	6	10	10
10	B	7	9	10	5	7	8
11	A	8	10	10	8	10	10
12	C	7	10	10	5	6	6
13	C	8	9	9	6	7	8
14	B	7	8	10	5	7	10

TL – Terapia láser; A – Terapia láser con una dosis de terapia de 6 J/cm²; B – Terapia láser con una dosis de terapia de 2 J/cm²; C – Terapia láser placebo.

A partir de los datos de la tabla 28 se obtuvo la media de las puntuaciones de ambos evaluadores para el conjunto de heridas pertenecientes a cada grupo para los días 0 y 2 del ensayo. Estos resultados muestran como en todos los grupos se observó una mejoría de las heridas entre los días 0 y 2 del ensayo (Tabla 29)

Tabla 29. Puntuaciones medias de las heridas incluidas por grupo de ensayo para los días 0 y 2.

Grupo	Día de ensayo	n	Puntuación media
A	0	4	6,875
	2	4	8,500
B	0	5	6,800
	2	5	9,700
C	0	5	6,400
	2	5	8,400

Grupo A – pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de terapia de 6 J/cm²; Grupo B – Pacientes que recibieron una terapia láser con una dosis de terapia de 2 J/cm²; Grupo C – Pacientes que recibieron una terapia láser placebo; n – número de pacientes por cada grupo en los días 0 y 2 del ensayo; Puntuación media – puntuación media obtenida a partir de las valoraciones de los dos evaluadores para cada conjunto de heridas de los diferentes grupos y días 0 y 2 del ensayo.

El análisis estadístico llevado a cabo a partir de los datos de la tabla 29 permitió observar una mejor evolución de la herida de ambos grupos de ensayo (Grupo A y B) con respecto al grupo control, siendo estadísticamente significativo ($\beta = -0,310$, IC95% 0,361-2,239; $p=0,011$) para las heridas de los pacientes pertenecientes al Grupo B (Tabla 30).

Tabla 30. Análisis univariable de regresión lineal con respecto a la puntuación de las heridas el día 2 del ensayo para las distintas terapias láser.

	Beta	Razón de medias	IC95%Inf	ICSup	p
Láser					
Grupo C (Placebo)	1				
Grupo A (6 J/cm ²)	-2.940	0,05	0,895	1,095	0,829
Grupo B (2 J/cm ²)	-0.310	0,73	0,361	2,239	0,011*

* Resultado estadísticamente significativo.

4.2. ENSAYO *IN-VITRO*

La medición de la temperatura llevada a cabo previo a la realización del estudio experimental reveló una variación de la misma de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ con respecto a los $23,5^{\circ}\text{C}$ iniciales.

Se sembraron un total de 40 cultivos microbiológicos, la mitad correspondientes a *S. intermedius* y la otra mitad a *E. coli*. El 20% (4/20) de los cultivos de cada uno de los tipos bacterianos correspondía a unos parámetros de tratamiento específicos. En el 100% de los cultivos hubo crecimiento (Tabla 31).

Tabla 31. Número de UFC por placa de siembra para cada una de las muestras irradiadas en cada placa.

Bacteria	Placa	Radiación	UFC/Placa
<i>S. intermedius</i>	1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	410
<i>S. intermedius</i>	1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	370
<i>S. intermedius</i>	1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	910
<i>S. intermedius</i>	1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	400
<i>S. intermedius</i>	2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	110
<i>S. intermedius</i>	2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	240
<i>S. intermedius</i>	2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	450
<i>S. intermedius</i>	2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	160
<i>S. intermedius</i>	3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	360
<i>S. intermedius</i>	3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	300
<i>S. intermedius</i>	3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	190
<i>S. intermedius</i>	3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	140
<i>S. intermedius</i>	4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	190
<i>S. intermedius</i>	4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	120
<i>S. intermedius</i>	4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	250
<i>S. intermedius</i>	4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	270
<i>S. intermedius</i>	5	Placebo	230
<i>S. intermedius</i>	5	Placebo	270
<i>S. intermedius</i>	5	Placebo	170
<i>S. intermedius</i>	5	Placebo	340

Tabla 31 continuación. Número de UFC por placa de siembra para cada una de las muestras irradiadas en cada placa.

Bacteria	Placa	Radiación	UFC/Placa
<i>E. coli</i>	1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	330
<i>E. coli</i>	1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	130
<i>E. coli</i>	1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	110
<i>E. coli</i>	1	2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	100
<i>E. coli</i>	2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	110
<i>E. coli</i>	2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	180
<i>E. coli</i>	2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	300
<i>E. coli</i>	2	10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	200
<i>E. coli</i>	3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	180
<i>E. coli</i>	3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	290
<i>E. coli</i>	3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	140
<i>E. coli</i>	3	20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	120
<i>E. coli</i>	4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	170
<i>E. coli</i>	4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	160
<i>E. coli</i>	4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	230
<i>E. coli</i>	4	20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	70
<i>E. coli</i>	5	Placebo	160
<i>E. coli</i>	5	Placebo	110
<i>E. coli</i>	5	Placebo	230
<i>E. coli</i>	5	Placebo	120

En el caso de la bacteria *Staphylococcus intermedius*, se observó que solo la TL donde se empleó una dosis de 2 J/cm², con una potencia de 3 Wa y frecuencia de 50 Hz produjo un incremento relativo de la media del LN de UFC del 98% (Razón de medias 1,98) de manera significativa ($\beta = 0,683$, IC95% 0,030-1,339; $p=0,042$). El resto de las radiaciones produjeron un decremento estadísticamente no significativo (Tabla 32).

Tabla 32. Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *S. intermedius* para los distintos tipos de terapia láser.

<i>S. intermedius</i>	Beta	Razón de medias	ICInf	ICSup	p
Láser					
2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	0,683	1,98	0,030	1,339	0,042*
10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	-0,160	0,85	-0,814	0,497	0,613
20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	-0,056	0,95	-0,711	0,600	0,859
20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	-0,212	0,81	-0,867	0,444	0,502

* Resultado estadísticamente significativo

En el caso de las bacterias tipo *E. coli*, no se observó ninguna variación significativa con respecto al grupo control (tabla 33).

Tabla 33. Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *E. coli* para los distintos tipos de terapia láser.

<i>E. coli</i>	Beta	Razón de medias	ICInf	ICSup	p
Láser					
2 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	-0,007	0,99	-0,678	0,663	0,982
10 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	0,220	1,25	-0,447	0,894	0,488
20 J/cm ² ; 3 Wa; CW	0,150	1,16	-0,523	0,818	0,646
20 J/cm ² ; 3 Wa; 50 Hz	-0,026	0,97	-0,697	0,645	0,935

Tras este análisis los resultados se agruparon según el tipo de frecuencia empleada. De esa manera, la frecuencia continua (CW) y la frecuencia pulsada de 50 Hz se compararon entre los grupos (placas 1-4) con respecto al grupo control (placa 5).

En el caso de los *Staphylococcus intermedius*, se observó que la frecuencia pulsada provocaba un incremento relativo de la media con respecto al grupo control, mientras que la frecuencia continua provocaba un decremento. Ambas diferencias ocurrieron de manera no significativa (Tabla 34).

Tabla 34. Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *S. intermedius* para los dos tipos de frecuencias empleados.

<i>S. intermedius</i>		Beta	Razón de medias	ICInf	ICSup	p
Láser						
	50 Hz	0,104	1,11	-0,547	0,755	0,740
	CW	-0,056	0,95	-0,853	0,742	0,885

Del mismo modo, en el caso de los *E. coli*, no se observaron variaciones estadísticamente significativas, aunque ambas mostraron un incremento relativo de la media con respecto al grupo control (Tabla 35).

Tabla 35. Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *E. coli* para los dos tipos de frecuencias empleados.

<i>E. coli</i>		Beta	Razón de medias	ICInf	ICSup	p
Láser						
	50 Hz	0,063	1,07	-0,458	0,586	0,801
	CW	0,148	1,16	-0,492	0,787	0,632

Por último, se analizaron los resultados agrupados según la dosis de energía empleada (2 J/cm², 10 J/cm² y 20 J/cm²).

En el caso de los *Staphylococcus intermedius*, se observó un incremento relativo de la media del LN de UFC del 98% (Razón de medias 1,98) de manera significativa ($\beta=0,683$, IC95% 0,047-1,320; $p=0,037$) para la dosis de 2 J/cm². Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las otras dos dosis empleadas, las cuales provocaron un decremento relativo de la media con respecto al grupo control (Tabla 36).

Tabla 36. Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *S. intermedius* para los distintos tipos de dosis empleados.

<i>S. intermedius</i>		Beta	Razón de medias	ICInf	ICSup	p
Láser						
	2 J/cm ²	0,683	1,98	0,047	1,320	0,037*
	10 J/cm ²	-0,159	0,85	-0,796	0,478	0,604
	20 J/cm ²	-0,134	0,87	-0,685	0,418	0,614

* Resultado estadísticamente significativo

Por el contrario, en el caso de los *E. coli*, ninguna dosis mostró resultados estadísticamente significativos con respecto al grupo control. La dosis de 2 J/cm² provocó una disminución relativa de la media, mientras que las otras dos provocaron un incremento con respecto al grupo control (Tabla 37).

Tabla 37. Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *E. coli* para los distintos tipos de dosis empleados.

<i>E. coli</i>	Beta	Razón de medias	ICInf	ICSup	p
Láser					
2 J/cm ²	-0,007	0,99	-0,660	0,645	0,982
10 J/cm ²	0,224	1,25	-0,429	0,876	0,478
20 J/cm ²	0,061	1,06	-0,504	0,626	0,822

5. DISCUSIÓN

5.1. DISCUSIÓN DEL ENSAYO *IN-VIVO*

5.1.1. DISCUSIÓN DEL MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se optó por realizar un estudio prospectivo, controlado, aleatorizado, ciego del observador y con análisis enmascarado. Este tipo de ensayo, situado en la zona más alta de la pirámide de evidencia científica²¹³, está diseñado para dar la mayor confianza a los resultados mediante la limitación de los sesgos de confusión, selección e información.

Para minimizar el sesgo de confusión se realizó la aleatorización de los pacientes incluidos en el ensayo y así poder realizar una comparabilidad homogénea entre los grupos. Por su parte, el sesgo de información puede provocar errores de medición de cualquier factor que influya sobre la variable a estudio. Para evitar esto, se optó por un estudio ciego del observador y análisis enmascarado. Y, por último, el sesgo de selección desencadena errores sistemáticos que se producen durante la selección y/o seguimiento de los pacientes de la población de estudio. En nuestro ensayo minimizamos este posible error mediante la realización de un estudio prospectivo y, nuevamente, aleatorizado.

Se decidió calcular el tamaño muestral definitivo a partir de un análisis estadístico preliminar de un estudio piloto de cuatro meses de ensayo. Tan solo catorce pacientes que cumplieron los criterios de inclusión fueron incluidos durante julio y octubre de 2017. Este bajo tamaño muestral inicial pudo ser debido a la baja casuística que el HCV-UAX presenta durante el periodo estival. Sin embargo, el análisis estadístico de este reducido número de pacientes nos permitió obtener unos resultados estadísticamente significativos y con ello concluir la parte experimental del ensayo. Además, se descartó la posibilidad de ampliar el tamaño muestral debido a la finalización del contrato de cesión del equipo por parte de la casa comercial.

El principal criterio de inclusión fue ser un paciente canino con herida traumática sin tratamiento antibiótico previo. Se decidió elegir exclusivamente la especie canina por suponer la especie, dentro de los animales de compañía, que visitaba con mayor frecuencia el HCV-UAX. Por otro lado, según la clasificación realizada por el Centro de Control de Enfermedades (CDC- *Center for Disease Control*), todas las heridas

traumáticas accidentales se consideran heridas Clase III, y por lo tanto contaminadas.¹²⁴ Esto nos facilitaría obtener una carga bacteriana inicial que pudiera servir de comparativa a la obtenida al finalizar el ensayo clínico. Por último, la ausencia de tratamiento antibiótico previo nos permitiría descartar el posible efecto de los mismos sobre la carga bacteriana inicial presente en las heridas, y con ello la alteración de los resultados de nuestro ensayo.

Algunas de las variables seleccionadas para la realización del presente trabajo se eligieron por ser evaluadas en otras publicaciones, mientras que el resto fueron elegidas por no haber sido consideradas antes, y, además, por su facilidad de recogida y procesado.

5.1.2. DISCUSIÓN DE LA IMPORTANCIA DE LAS HERIDAS CLASE III Y SU CORRECTO MANEJO

Se decidió estudiar el efecto de la TL sobre heridas Clase III por lo que representan a nivel clínico, económico y epidemiológico tanto en medicina humana como veterinaria.

Cualquier herida accidental requiere de un correcto manejo que favorezca el proceso de cicatrización natural de la misma. Se ha estimado el “periodo de oro” de dicho manejo en las primeras 6 horas después de producirse el traumatismo.^{125–127} Sin embargo, existen muchos factores asociados a un retraso en la cicatrización. Bendy y cols. describieron por primera vez en 1964 cómo la infección bacteriana supone una de las causas que pueden provocar este tipo de alteraciones.²¹⁴ El retraso de un proceso de cicatrización natural determinará que una herida pase a ser considerada crónica.²¹⁵ Hoy en día ya se conoce la repercusión directa que tiene un proceso infeccioso sobre la salud de los pacientes, aumentando la morbilidad y mortalidad de los mismos²¹⁶, así como los costes hospitalarios.²¹⁵ Hace 10 años se estimaba un gasto de 25 billones de dólares solo en el manejo de heridas crónicas de seres humanos en un país como es Estados Unidos.²¹⁷ Se cree que estos gastos se han incrementado considerablemente debido a la subida de los costes sanitarios, al envejecimiento de la población y a la creciente incidencia de enfermedades como la diabetes y la obesidad.²¹⁷ Zoutman y cols.

determinaron, en su estudio de heridas crónicas infectadas, que el tiempo medio de estancia hospitalaria aumentaba hasta los 10 días, lo que provocaba un incremento del coste de 4000 \$ por paciente e infección.²¹⁸

Dentro de las posibles etiologías de las heridas Clase III, en los pacientes del ensayo tan solo se observaron aquellas causadas por cortes accidentales y por mordiscos de otros perros. Estas últimas son las que se presentaron en mayor número (64,3 %; 9/14).

Las heridas secundarias a un mordisco deben considerarse contaminadas no solo por las bacterias orales del perro agresor, sino también por la flora cutánea del perro mordido, así como por microorganismos del suelo o entorno.¹³¹ Los efectos secundarios del ataque de un perro sobre el tejido, como la creación de espacios muertos, tejido devitalizado o acumulación de líquidos, favorecerán un medio de cultivo idóneo para el crecimiento de las bacterias inoculadas.^{219,220} Además, este tipo de heridas son las que están mejor documentadas tanto en medicina humana como veterinaria.^{177,221–224}

Algo similar ocurre con aquellas heridas secundarias a un traumatismo accidental, como pueda ser un corte, una laceración o una herida punzante, donde bacterias de la piel y del entorno penetran en el tejido provocando una colonización bacteriana y su consiguiente contaminación.

El grado de infección parece estar asociado a la carga bacteriana y al tipo o tipos de microorganismos presentes en este tipo de heridas. Una carga bacteriana superior a 10^5 bacterias por gramo de tejido (o por mililitro de exudado) confirmará que la herida se encuentra infectada.^{125,225–227} Por otro lado, diversos autores califican las heridas como infectadas a partir del análisis citológico del exudado de las mismas, donde la presencia de bacterias intracelulares determina la infección²²⁸, o incluso a partir del tiempo transcurrido desde el traumatismo.¹²⁵ Los signos clínicos de eritema, edema, exudado y olor también pueden determinar que una herida esté infectada.²²⁹ Actualmente el CDC considera el exudado purulento como principal signo de una infección, y especialmente cuando se acompaña de fiebre y/o inflamación local.²³⁰

Por el contrario, un cultivo positivo no determinará una infección, puesto que las heridas contaminadas también los presentan.²²⁸ Goldstein determinó en su estudio de

1992 que menos del 20% de las heridas contaminadas con cultivo positivo acaban desarrollando una infección tisular.²³¹

En nuestro ensayo clínico no contabilizamos el grado de infección de las heridas, sino que tan sólo se confirmó la contaminación bacteriana a partir de los cultivos positivos y de los signos clínicos evaluados a partir de la valoración visual de las mismas.

Según lo comentado hasta ahora, las heridas traumáticas agudas se consideran contaminadas, pero, *a priori*, no infectadas. No todas estas heridas requieren de un tratamiento médico, aunque el desconocimiento en cuanto al efecto de la terapia láser sobre la carga bacteriana de las heridas de los pacientes del estudio, así como la necesidad de estandarizar un protocolo homogéneo de actuación en todos ellos, nos hizo plantearnos el uso de manera sistémica y profiláctica de un antibiótico aunque presente controversias^{127,232,233}, incluso en heridas secundarias a mordiscos.^{132,234} La multitud de microorganismos que pueden entrar en juego en la contaminación/infección de una herida, y la falta de antibióticos que presenten efectividad de manera individual frente a todos esos patógenos, puede ser la razón de estas discrepancias.^{234,235} Por todo ello, además, se recomienda estandarizar la realización de cultivos microbiológicos cuando nos enfrentamos a una herida contaminada/infectada para recurrir al antibiótico ideal en caso de necesidad.²²⁸

En nuestro ensayo, a pesar de tratar heridas traumáticas agudas sin la confirmación de una infección bacteriana inicial, decidimos emplear una cefalosporina de tercera generación como la cefovecina. Según diversos estudios, tanto en medicina humana como veterinaria, el antibiótico sistémico de primera opción en el tratamiento de heridas traumáticas infectadas es la amoxicilina con ácido clavulánico, en gran parte debido a su amplio espectro de acción frente a bacterias gram negativas y positivas tanto aerobias como anaerobias.^{228,236} Sin embargo, decidimos emplear la cefalosporina según las recomendaciones de Meyer y cols., quienes sugieren este tipo de antibióticos como segunda opción en el tratamiento de heridas infectadas.²²⁸

La cefovecina es un antibiótico seguro y con un amplio espectro de acción. Además, presenta una duración de hasta 14 días tras una única dosis, donde los niveles terapéuticos tisulares se mantienen constantes.²³⁷ Esto elimina las posibles

fluctuaciones antibióticas por debajo de la concentración mínima inhibitoria para los patógenos, así como el incumplimiento por parte de los propietarios de las pautas médicas que se pudieran establecer.²³⁸ Su eficacia y seguridad en el tratamiento de heridas infectadas, piodermas, abscesos o foliculitis ha sido demostrada por diversos autores.^{238,239} Incluso, no muestra diferencias clínicas relevantes en cuanto a su efecto terapéutico en el tratamiento de infecciones bacterianas de piel en pacientes caninos cuando se compara con la amoxicilina con ácido clavulánico.²³⁹

Por otro lado, según diversos autores, el éxito de una correcta cicatrización radica en facilitar el propio proceso de cicatrización de la herida.^{125,240} Para ello, llevar a cabo un desbridamiento del tejido necrótico, realizar un lavado profuso, eliminar espacios muertos o cubrir las heridas, forma parte del manejo ideal de este tipo de lesiones.^{240,241} Por todo esto, y a parte del tratamiento médico, estandarizamos para todos los pacientes del ensayo un protocolo de actuación frente a ellas.

Decidimos realizar para cada una de las heridas incluidas en el ensayo el desbridamiento de todo el tejido desvitalizado. Diferentes autores recomiendan la eliminación de todo el tejido necrótico presente en la herida ya que su presencia repercutirá en una incorrecta evolución de la cicatrización.^{127,178,240} Del mismo modo, realizamos el lavado de la herida con un suero cristaloide, como es el suero Ringer Lactato. Diversos autores recomiendan en sus estudios el empleo de este tipo de solución^{125,242}, en gran parte por su falta de efectos adversos sobre los fibroblastos.²⁴³ Se eligió realizar un lavado con 50 ml/cm² de superficie de herida según recomienda en su ensayo de 2014 Barnes y cols.²⁴⁴

La presión de lavado también parece tener su importancia terapéutica, ya que por una parte es necesario realizar el arrastre de todo material inerte y bacteriano que pueda presentar la herida, y, por otra parte, evitar incrustar en el tejido cualquier materia, viva o muerta, que pueda provocar una mala evolución del proceso de cicatrización natural. Existen diferentes sistemas de irrigación, sin embargo, la mejor manera de obtener una presión constante y con el que se han observado los mejores resultados parece ser con el uso de mangas de infusión similares a la empleada en nuestro ensayo.²⁴⁵ Este tipo de sistema, nos permitió controlar y monitorizar la presión

de infusión en los 300 mmHg, valor de presión idónea sugerido por diferentes autores.^{130,232}

La falta de un grupo control que no recibiera el tratamiento médico con cefovecina y/o el manejo propio de la herida, limita la posibilidad de interpretación del efecto único por parte de la terapia láser en la evolución de las heridas, aunque en esos casos, los pacientes con signos severos de infección deberían ser excluidos por razones éticas. En futuras investigaciones sería oportuno poder incluir un grupo experimental donde no se emplee, al menos, el tratamiento antibiótico.

5.1.3. DISCUSIÓN DEL EMPLEO, PARÁMETROS Y MÉTODO DE IRRADIACIÓN DE LA TERAPIA LÁSER SOBRE HERIDAS CLASE III

En medicina veterinaria, la terapia láser es una técnica que se ha incorporado recientemente en la actividad clínica. Los conocimientos acerca del uso de los distintos equipos láser se limitan en gran parte a la extrapolación de los resultados de la aplicación de TL sobre pacientes humanos o animales de experimentación. La falta de protocolos estandarizados para el tratamiento de patologías específicas hace que el clínico veterinario a menudo se guíe por las recomendaciones del fabricante del equipo empleado, aunque cada vez son más las referencias bibliográficas que aportan parámetros de terapia específicos.

En el tratamiento de heridas, la terapia láser de bajo nivel presenta un gran valor y varias revisiones bibliográficas, sobre todo estudios experimentales, muestran resultados favorables sobre este tipo de patologías.^{246,247} Además, se ha convertido en una importante herramienta complementaria a los tratamientos convencionales.^{57,174,248} Sin embargo, su efecto antibacteriano directo se encuentra en entredicho, en parte debido a la variedad de resultados expuestos en la literatura actual, y que posteriormente desarrollaremos.

En nuestro ensayo clínico decimos establecer el efecto de la TL como objetivo principal del mismo. Para ello creamos dos grupos experimentales junto al grupo control. Los parámetros de terapia fueron elegidos siguiendo en parte las

recomendaciones bibliográficas actuales, así como por la experiencia y conocimientos del equipo de investigación.

Entre los parámetros de tratamiento de TL empleados en nuestro ensayo la dosis (J/cm^2) fue la única variable entre los grupos. La elección de 6 y 2 J/cm^2 para los grupos A y B respectivamente, se planteó por estar dentro del rango terapéutico de dosis empleadas en el tratamiento de heridas agudas con láseres Clase IV ($1-10 \text{ J}/\text{cm}^2$)²¹⁰, y similar a la de otros estudios donde se emplea la TL en la cicatrización de heridas.^{35,36,212,249} Según una revisión llevada a cabo por Da Silva y cols., dosis entre 3 y 6 J/cm^2 presentan un mayor efecto terapéutico en la cicatrización de heridas en comparación con el empleo de dosis superiores a 10 J/cm^2 .⁴⁰ Sin embargo, se han llegado a observar efectos positivos con el uso de dosis de hasta 30 J/cm^2 al tratar heridas en ratas.²⁵⁰

En los casos de heridas infectadas, la literatura científica recomienda comenzar con una densidad de energía de 4-6 J/cm^2 con tratamientos diarios durante 2-5 días.²¹⁰ Gomes y cols. comprobaron como el empleo de la TL sobre heridas infectadas con *Staphylococcus aureus* MRSA en ratas parece presentar una disminución de la proliferación bacteriana cuando se emplea a una dosis de 5 J/cm^2 .²⁰⁵ Del mismo modo, la TL a una dosis de 2,4 J/cm^2 parece prevenir el crecimiento bacteriano en heridas por quemaduras de tercer grado en esa misma especie.¹⁴⁸

En cuanto a la densidad de potencia (W/cm^2), se mantuvo constante para todas las terapias láser en 0,2 W/cm^2 . Este valor, al igual que ocurre con la dosis, se encuentra dentro del rango recomendado para el tratamiento de heridas, el cual oscila entre 0,1 y 0,5 W/cm^2 . En un reciente meta-análisis, realizado a partir de ensayos *in-vivo* con animales de experimentación, se concluye que los estudios que utilizan una densidad de potencia entre 53 y 200 mW/cm^2 de luz infrarroja, logran los mejores resultados en la contracción de heridas cuando se compara con densidad de potencias más bajas.²⁵¹ Nuestro valor para la densidad de potencia coincide con el usado por De Sousa y cols. en su estudio *in-vitro* cuando emplean una longitud de onda de 830 nm.²⁵² La densidad de potencia es un parámetro esencial en el manejo del potencial efecto foto-térmico de la TL. De esa manera, un uso incorrecto, como puede ser una densidad de potencia elevada, puede suponer desde una molestia en el paciente por calentamiento del tejido

irradiado, hasta la producción de quemaduras en los casos más extremos. De hecho, densidades de potencia elevadas explican el mecanismo de acción de los láseres destinados a cirugía, los cuales emplean de cientos a miles de W/cm^2 por terapia, consiguiendo desde la coagulación y contracción tisular, hasta cortes quirúrgicos o vaporización celular. El uso correcto de la densidad de potencia proporciona el efecto foto-químico deseado y es responsable de la fotobiomodulación.

La longitud de onda tiene una influencia directa sobre los cromóforos, y en el caso de las bacterias, se ha propuesto como uno de los posibles mecanismos antibacterianos de la luz. Aunque la luz azul (380-475 nm) carece de algunos de los efectos biológicos de la luz roja e infrarroja en el tratamiento de heridas, su efecto antibacteriano^{253,254} y antifúngico²⁵⁵ se ha descrito. Este efecto antibacteriano aún permanece bajo discusión en el caso de la luz roja e infrarroja. En nuestro ensayo, decidimos emplear las cuatro longitudes de onda (660, 800, 905 y 970 nm) de las que disponía el equipo láser con el fin de maximizar el espectro de células diana, al igual que realizó en su ensayo Renwick y cols.³

Por último, el equipo láser nos permitió emplear, a parte de la frecuencia continua, una frecuencia de pulsado desde 1 hasta 20.000 Hz, y hasta 10 frecuencias distintas por terapia. En la práctica clínica, si el equipo lo permite, el empleo de más de una frecuencia de terapia, y la combinación de frecuencias pulsadas y continua, favorece el efecto de la luz sobre distintos tipos celulares. En el ensayo *in-vivo* decidimos emplear 5 tipos de frecuencia por terapia láser donde incluimos una combinación de una frecuencia continua (CW), dos frecuencias bajas (50 y 500 Hz), una media (5.000 Hz) y una alta (20.000 Hz). El uso de la frecuencia continua (CW) es el más documentado en la bibliografía actual^{148,173,174,208,256}, mientras que otros autores emplean diferentes tipos de frecuencia pulsada desde los 2 Hz²⁵⁷ hasta los 20.000 Hz.²⁵⁸ No existe un consenso en el uso de la luz pulsada con respecto a la continua, sin embargo, los beneficios clínicos en el tratamiento de heridas parecen ser mayor con el uso de luz pulsada en comparación con la luz continua.²⁵⁹

La TL se aplicó mediante un método de “escaneo” sin contacto directo sobre la superficie delimitada del paciente. El método de elección en aquellos casos en donde la TL no se aplique sobre una herida es mediante contacto directo de la pieza de mano con

el tejido²⁶⁰, sin embargo, la presencia de una herida inflamada y con la sensación nociceptiva aumentada, hace que el contacto de la pieza de mano sobre el tejido afectado pueda provocar molestia e incluso dolor en el paciente. Aplicar la TL a una distancia de 1 a 2 cm de altura con respecto a la superficie, así como incluir de 2 a 5 cm de tejido sano circundante a la herida, en un modo de “escaneo”, es el método recomendado en la práctica clínica cuando tratamos este tipo de patologías.²¹⁰ Además, el efecto acumulativo de la TL descrito por varios autores^{210,261,262} nos sirvió para planificar el protocolo de irradiación durante 3 días consecutivos, aunque tan solo las dos primeras repercutieran en los resultados microbiológicos.

La delimitación del área de tratamiento y muestreo nos permitió estandarizar la carga bacteriana y energía (J) por cm² de superficie en todos los pacientes y, además, nos facilitó la recogida de las muestras microbiológicas del día 0 y 2 del ensayo. El empleo de moldes opacos estériles eliminaba la posibilidad de irradiar más tejido del delimitado, así como la posibilidad de muestrear bacterias no incluidas en esa área.

5.1.4. DISCUSIÓN DE LA TOMA DE MUESTRAS Y SU PROCESADO

El método de muestreo empleado fue una modificación del método *Levine*, donde toda el área incluida dentro del molde fue muestreada con un hisopo estéril de algodón humedecido mediante rotación del mismo en tres direcciones distintas con respecto a la superficie. Aunque una biopsia de tejido parece ser el método más específico y sensible para la determinación de una infección^{176,216}, su coste, trauma o incluso posible exacerbación del proceso infeccioso y de cicatrización, hace de la muestra con hisopo un método más seguro.²²⁷ Según diversos autores no existen diferencias en la identificación de bacterias aisladas de heridas infectadas entre la muestra por biopsia y la muestra con hisopo.^{227,263–265}

Para el cultivo de las muestras se eligió emplear el agar Sangre por ser un medio rico en nutrientes y que permite el crecimiento de bacterias sin requerimientos nutritivos especiales, tanto gram positivos como negativos. Por su parte, la elección del cultivo de agar MacConkey nos permitió observar el crecimiento selectivo de un gran número de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, como son bacterias del género

Escherichia spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp. o *Klebsiella* spp. entre otros, otras de la familia *Pseudomonadaceae*, como el género *Pseudomonas* spp., de la familia *Pasteurellaceae* como bacterias del género *Pasterella* spp. y alguna especie muy específica de enterococos. Las bacterias pertenecientes a estos géneros, localizadas principalmente en el tracto digestivo, se consideran bacterias oportunistas colonizadoras de heridas y su presencia supone en un alto porcentaje la infección de la herida. La elección de estos medios de cultivo coincide con el método empleado por Mouro y cols. para la detección de bacterias en heridas infectadas en pacientes caninos secundarias al ataque de otro perro.²⁶⁶

5.1.5. DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS GENERALES

Debido al pequeño tamaño muestral y a la diversidad de razas obtenidas, dicha variable no fue sometida a un análisis estadístico. Sería necesario un tamaño muestral mayor para establecer una relación que fuese significativa entre la raza y la variable dependiente.

Para el resto de variables: edad, sexo, estado reproductor y peso, tan solo la variable correspondiente al estado reproductor presentó un valor tendente a la significación en el análisis univariable para los cultivos a las 72 horas en agar Sangre. Su posterior inclusión en el análisis multivariable no mostró resultados significativos que pudieran hacernos pensar que estar o no castrado pudiera influir en los resultados del ensayo. Aunque, la presencia de andrógenos en machos enteros sí que ha sido descrita anteriormente como una posible desventaja en la cicatrización de las heridas, debido, en parte, a la modulación que representa en el grosor de las capas superficiales de la piel y de la funcionalidad del sistema inmune.²⁶⁷

Del mismo modo, la edad y el peso también parecen influir en el proceso de cicatrización de las heridas, objetivo analizado de manera secundaria en el presente trabajo. En medicina humana son varios los estudios que muestran como los pacientes de mayor edad y con sobrepeso presentan una peor capacidad de cicatrización.²⁶⁸ En medicina veterinaria, el sobrepeso también está asociado a una mayor predisposición de aparición de infección del sitio quirúrgico.²⁶⁹ En nuestro ensayo, quizás debido al

tamaño muestral, no observamos una relación entre estas variables y el proceso de cicatrización de las heridas, así como de la evolución de la carga bacteriana.

De acuerdo con los conocimientos de los autores, no existe ningún estudio similar al nuestro que nos permita comparar los resultados obtenidos con los de otros investigadores de una manera más directa.

5.1.6. DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES ESPECÍFICAS DE LA HERIDA

Aunque se tuvo en cuenta el número total de heridas que pudiera presentar un paciente, tan solo una de ellas fue incluida en el ensayo con el objetivo de unificar los valores en todos ellos. Esta variable, junto con la etiología y la localización de la herida fueron incluidas en el análisis univariable. Los resultados obtenidos en este análisis no mostraron que ninguna de las variables influyera sobre las UFC a las 72 horas para ninguno de los dos tipos de cultivos.

Las dos diferentes etiologías de las heridas del ensayo podrían tener su repercusión en la evolución clínica de las mismas, incluso bajo las mismas condiciones de tratamiento. De nuevo, el reducido número de casos para cada una de ellas puede haber supuesto que esta variable no determine resultados estadísticamente significativos.

Aumentar el número de pacientes en futuras investigaciones podría favorecer la presencia de una relación entre estas variables y los resultados.

5.1.7. DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES ESPECÍFICAS DEL TRATAMIENTO

De las variables analizadas en el análisis univariable: terapia láser (Grupo A, B y C), meloxicam, tramadol, sedación, puntos de sutura, drenaje, vendaje, enfermedades concurrentes, tratamiento actual y hospitalización, ninguna de ellas presentó unos resultados estadísticamente significativos. El tamaño muestral puede haber influido de nuevo en la interpretación de estos resultados.

Existen numerosos estudios, principalmente en medicina humana, que observan una relación directa entre la presencia de una enfermedad concomitante^{268,270,271}, tratamientos médicos (especialmente corticoesteroides o quimioterápicos)^{268,272,273} o estancias hospitalarias prolongadas^{274,275}, con respecto al proceso de cicatrización de una herida o la carga bacteriana de un proceso infeccioso. Sin embargo, no existe ningún estudio similar al nuestro en medicina veterinaria que nos permita una comparación más directa de los resultados.

De todas las variables, los tres grupos de terapia láser se incluyeron por su relevancia clínica en el análisis multivariable. Su inclusión favoreció la aparición de resultados estadísticamente significativos que valoraremos a continuación.

5.1.8. DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES MICROBIOLÓGICAS

La variable UFC pre-tratamiento para ambos cultivos en el día 0 del ensayo no mostró resultados estadísticamente significativos en el análisis univariable, aunque su inclusión en el análisis multivariable si los ofreciera para los cultivos en agar Sangre.

Con respecto al sumatorio de horas entre la toma de muestras de los cultivos del día 0 y 2, tan solo la variable correspondiente a los cultivos en agar Sangre mostró unos resultados estadísticamente significativos en el análisis univariable llevado a cabo. Su posterior inclusión en el análisis multivariable también nos permitió observar resultados estadísticamente significativos que posteriormente valoraremos.

No existen estudios similares con los que poder comparar nuestros resultados en relación a estas variables microbiológicas.

5.1.9. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS OBTENIDOS

El 100% de los cultivos realizados en agar Sangre el día 0 del ensayo fueron positivos, determinando de ese modo el grado de contaminación inicial de las heridas, y, por consiguiente, la no exclusión de ninguno de los pacientes incluidos en el ensayo. En el caso del agar MacConkey, tan solo se observó crecimiento bacteriano en el 28,6%

de los cultivos del día 0. Para los cultivos del día 2, se observó crecimiento en el 100% y 42.9% de los cultivos en agar Sangre y agar MacConkey respectivamente. La identificación bacteriana, realizada a partir de los cultivos del día 0 y 2 en agar Sangre, muestra un total de 67 cepas bacterianas con predominio de las bacterias gram positivas (71,65 %) sobre las gram negativas (28,35 %). Esta baja prevalencia de bacterias gram negativas podría explicar la falta de resultados a partir de los cultivos de agar MacConkey, y que discutiremos a continuación.

Diversos autores exponen en sus estudios la multitud de microorganismos que participan en la infección de heridas traumáticas^{176,241}, y en especial aquellas secundarias a mordiscos.^{223,228,266,276-278} Los géneros *Staphylococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Streptococcus* spp. y diversos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* son los más representativos^{223,228}, siendo *Pasteurella multocida*^{177,228,241} y *Staphylococcus intermedius*^{228,241} las especies más comúnmente aisladas dentro de las bacterias aerobias. También se ha descrito que, debido a la creación de espacios muertos subcutáneos, bacterias anaerobias del género *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp. y *Prevotella* spp. participan en el desarrollo de las infecciones de este tipo de heridas traumáticas.^{236,278}

Nuestra identificación bacteriana fue similar a la descrita en la literatura para este tipo de heridas traumáticas, especialmente por las especies del género *Staphylococcus* spp. aisladas. Sin embargo, a diferencia de lo publicado, en nuestro ensayo fue aislado un reducido tamaño de bacterias del género *Pasteurella* spp.

Además, la identificación nos permitió concluir la presencia de una flora polimicrobiana asociada a las heridas traumáticas en todos nuestros pacientes como también describen otros autores.^{176,177,279,280}

La influencia de la carga microbiana sobre el proceso de cicatrización de las heridas dependerá de la cantidad y el/los tipo/s de microorganismo/s, la relación entre ellos y el hospedador, y por las condiciones locales y ambientales de la propia herida entre otros. Disminuir el número de microorganismos es una parte esencial en la evolución de las heridas, aunque ayudar al hospedador a hacer frente a la infección,

mediante la regulación de la respuesta inflamatoria o la mejora del sistema inmune, también tiene una importante repercusión clínica.¹⁷⁶

5.1.10. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA VALORACIÓN DE LAS HERIDAS

Para la realización de esta valoración se utilizó una escala de puntuación que inicialmente fue desarrollada para clasificar heridas en seres humanos¹, ya que hasta la fecha no existe ninguna destinada a heridas en animales de compañía. Esta escala fue diseñada inicialmente para valorar los signos clínicos de heridas crónicas. Decidimos modificar esta escala mediante la exclusión de dos parámetros de cronicidad como son la presencia de fibrosis y la cicatrización de los bordes, y añadimos dos signos agudos como pueden ser la presencia de hematoma y de un cultivo microbiológico positivo. La valoración visual fue llevada a cabo por dos evaluadores con más de quince años de experiencia en cirugía de tejidos blandos, ambos desconocedores de la identidad del paciente al que correspondía cada fotografía.

Los resultados obtenidos parecen ser consistentes en cuanto a una correcta cicatrización en el tiempo, ya que muestran que todos los grupos mejoraban la puntuación entre los días 0 y 2. El análisis estadístico realizado nos permitió comparar los grupos experimentales (Grupo A y B) con respecto al grupo control (Grupo C). De esa manera, se observó una mejor cicatrización por parte de los grupos experimentales con respecto al grupo control, donde los resultados para el Grupo B fueron estadísticamente significativos.

Esta mejoría también ha sido descrita por otros autores cuando emplean la TL sobre heridas y estudian el efecto de reparación tisular de las mismas.^{123,147,150,159,162,164}

En la interpretación de estos resultados debemos tener en cuenta el reducido número de casos, así como el corto periodo en el que las heridas fueron valoradas.

5.1.11. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL MODELO MULTIVARIABLE

Las variables que conformaron el modelo multivariable y que explican de manera independiente y significativa el número de colonias en el cultivo post-tratamiento en agar Sangre fueron: la carga bacteriana, el número de horas entre que se tomó las muestras del cultivo pre-tratamiento y post tratamiento y la terapia láser.

La carga bacteriana inicial (pre-tratamiento) de las heridas mostró unos resultados estadísticamente significativos en el análisis multivariable con respecto a las UFC de los cultivos en agar Sangre del día 2 (post-tratamiento). Este resultado, obtenido de manera independiente al resto de variables, nos permite establecer que, aquellos cultivos iniciales que presentaron un elevado número de UFC presentarían del mismo modo un mayor número de UFC en el cultivo final al compararlos con aquellos cultivos con un número más reducido de UFC, aunque existiera un decremento para ambos. Es decir, a mayor carga bacteriana inicial, mayor carga bacteriana final, independientemente de la TL y el tiempo.

Por otro lado, el número de horas entre que se tomó el cultivo pre-tratamiento y post-tratamiento también mostró unos resultados estadísticamente significativos para los cultivos en agar Sangre. La interpretación de estos resultados nos permite concluir que, a mayor tiempo entre la toma de las muestras, mayor número de colonias fueron obtenidas en el segundo cultivo. Es lógico pensar que cuanto más tiempo pase en una herida, más tiempo tienen las bacterias para multiplicarse. Nuevamente, se trata de un resultado independiente con respecto al resto de variables.

El análisis del resto de variables nos permitió obtener que la terapia láser, con los parámetros empleados, disminuye en ambos grupos (Grupo A y Grupo B) de ensayo el número de UFC para los cultivos en agar Sangre entre los días 0 y 2 en comparación con el grupo control (Grupo C – placebo), siendo un resultado estadísticamente significativo para los pacientes del Grupo B.

Para los cultivos en agar MacConkey no se observó ningún resultado estadísticamente significativo para las variables analizadas. El crecimiento más selectivo por parte de estos medios pudo suponer el menor número de UFC observado para los

cultivos del día 0 y 2, comparado con las UFC que crecieron en agar Sangre. De este modo, ese reducido número de colonias determinó una pequeña variabilidad de resultados que no favorecieron el obtener unos valores de significación.

La disminución en el número de bacterias en ambos grupos de ensayo puede ser debida a un efecto directo de la terapia láser sobre las bacterias^{257,281,282}, a una mejora de la respuesta inmune del paciente^{283,284} o por una combinación de ambos mecanismos.

Diversos autores han mostrado en sus trabajos *in-vivo* el efecto de la TL en animales de experimentación al tratar tejidos infectados. De esa manera, Gomes y cols. y Santos y cols. han descrito en sus respectivos ensayos una inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* al tratar heridas infectadas en ratas con una dosis de terapia de 5 J/cm².^{205,285} Ranjbar y cols. también observaron una disminución de *S. aureus* junto con una mejora en la cicatrización de quemaduras de tercer grado en ratas con diabetes después de aplicar TL con una dosis de 3 J/cm².²⁰⁶ Resultados similares, con dosis más bajas (1,2 J/cm² y 2,4 J/cm²), fueron obtenidos por Bayat y cols. al tratar quemaduras de segundo grado infectadas en esa misma especie.¹⁴⁸

En la aplicación de TL sobre procesos infecciosos más profundos, también observaron una disminución en el recuento bacteriano después de tratar osteomielitis en ratas.²⁰⁸ Sin embargo, las dosis de terapia y densidad de potencia empleadas en su ensayo clínico variaron ligeramente con respecto al nuestro (7,64-22,9 J/cm² vs 2-6 J/cm² y 0,127 W/cm² vs 0,2 W/cm²). Por su parte, Krespi y cols. observaron una disminución del crecimiento bacteriano al tratar rinosinusitis en conejos causadas por *Streptococcus pneumoniae* donde los parámetros de terapia fueron 180 J/conejo y 940 nm.²⁰² Tres años después, ese mismo grupo de trabajo, emplearon la TL para tratar la colonización nasal en seres humanos con *S. aureus* empleando entre 200 y 600 J en cada orificio nasal y tres longitudes de onda distintas. Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la carga bacteriana en aquellos pacientes que además recibieron un tratamiento tópico con eritromicina.¹⁷⁴

A pesar de estos resultados, también existen estudios *in-vivo* donde no se observan efectos favorables por parte de la TL en el tratamiento de infecciones. Araujo

y cols. no observaron ningún efecto antibacteriano con el empleo de la TL sobre un modelo de artritis séptica en roedores. Aunque debemos mencionar que, aun empleando una dosis similar a la nuestra (2 J/cm^2), la falta de efecto observada puede deberse a la limitada capacidad de penetración que presenta una longitud de onda de 660 nm , principalmente cuando se quiere conseguir un efecto intra-articular.²⁸⁶ En el caso de Ezzati y cols. la falta de efecto microbiológico observada en su ensayo clínico sobre quemaduras de tercer grado en ratas puede deberse a la baja dosis empleada $0,396 \text{ J/cm}^2$.²⁸⁷

5.1.12. DISCUSIÓN DEL POSIBLE EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA TERAPIA LÁSER

El presente trabajo es el primer ensayo clínico que emplea la TL junto a una terapia coadyuvante sobre heridas contaminadas/infectadas en pacientes caninos y que estudia el efecto sobre la carga bacteriana de las mismas. La falta de estudios comparativos supone un reto a la hora de intentar comparar nuestros resultados *in-vivo* con los que hay descritos en la literatura actual. Además, los resultados obtenidos a partir de un ensayo clínico son más aplicables en la práctica clínica que aquellos resultados obtenidos a partir de ensayos *in-vitro* o experimentales *in-vivo*.

Uno de los mecanismos antibacterianos directos que han sido propuestos está basado en el efecto de la luz sobre las porfirinas endógenas de los patógenos.^{209,288} Estas porfirinas actuarían a modo de cromóforos que, al ser estimuladas por la luz láser, provocarían la liberación de radicales libres, los cuales dañarían la membrana citoplasmática de las proteínas y del ADN.²⁰¹ Este efecto bactericida o bacteriostático ocurre cuando el daño celular sobrepasa los mecanismos de reparación y el metabolismo microbiano es inhibido. Algunos autores describen las diferencias existentes entre los distintos tipos de bacterias irradiadas, donde las bacterias gram negativas parecen ser más vulnerables que las gram positivas bajo las mismas condiciones de terapia.^{173,289} Esto puede ser debido en gran parte a la diferencia que existe entre ambos grupos bacterianos en su pared de peptidoglicanos. Las bacterias gram positivas se caracterizan por presentar una pared de mayor grosor por su doble

membrana en comparación con la membrana simple de las gram negativas, lo que parece limitar la capacidad de penetración por parte de los fotones.^{173,289}

Esta posible variación entre bacterias gram positivas y gram negativas se pretendió visualizar en el ensayo *in-vivo* a partir de los cultivos de agar MacConkey. Dichos cultivos no mostraron una reducción relativa de la media de UFC de los cultivos del día 2 en comparación con los de agar Sangre. Esto podría suponer, *a priori*, un mayor efecto por parte de la terapia láser sobre las bacterias gram positivas en comparación con las gram negativas a diferencia de lo que teóricamente ha sido propuesto por varios autores.^{173,289} Sin embargo, el reducido número de cultivos positivos en el día 0 del ensayo puede ser la razón de que no se observe ningún cambio. Los cuatro cultivos que mostraron crecimiento en agar MacConkey el día 0 del ensayo redujeron el número de UFC en el día 2. Dos de ellos, pertenecientes al Grupo B (2 J/cm²), incluso lo redujeron a 0. Por otro lado, cuatro nuevos cultivos en agar MacConkey fueron positivos el día 2 sin haberlo sido el día 0. De los cuales tres de ellos pertenecen al grupo control (grupo C – placebo). Aunque estadísticamente, como se ha comentado, no se observan resultados significativos entre los grupos del ensayo y el grupo control, estos resultados “macroscópicos” si parecen mostrar un efecto de la terapia láser sobre las bacterias gram negativas que crecen en este medio.

Por todo ello se valoró realizar el estudio experimental *in-vitro*, con el principal objetivo de obtener unos resultados que pudieran confirmar el mayor efecto por parte de la TL sobre las bacterias gram negativas en comparación con las gram positivas.

5.2. DISCUSIÓN DEL ENSAYO *IN-VITRO*

5.2.1. DISCUSIÓN DEL MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental en noviembre de 2017. Este tipo de trabajo nos permitió simplificar las variables bajo estudio centrándonos directamente en el efecto de la TL sobre dos modelos bacterianos.

No existe ningún ensayo que copie la metodología empleada al nuestro, principalmente en cuanto a parámetros de terapia se refiere. Sin embargo, existen

estudios similares que sí observan el efecto directo de la TL sobre bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* spp. y *Escherichia* spp., aunque los parámetros de terapia empleados difieran a los nuestros.^{173,281,289}

Para la realización del trabajo *in-vitro* se eligió un *Staphylococcus intermedius* y una *Escherichia coli* en representación de las bacterias gram positivas y gram negativas respectivamente. El *S. intermedius* es una bacteria que habita en la piel y mucosas de mamíferos y aves, tratándose de patógenos oportunistas en la mayoría de las especies animales. En los últimos 35 años ha sido el patógeno del género *Staphylococcus* spp. más aislado en la clínica de pequeños animales.²⁹⁰ Dentro de este género, *S. intermedius* pertenece al denominado *Grupo Staphylococcus Intermedius* (SIG), formado además por *S. pseudointermedius* y *S. delphini*. Estas cepas están asociadas a infecciones de piel y tejidos blandos en animales, en especial en el perro.²⁹¹ Por su parte, *E. coli* es la enterobacteria comensal más abundante de la microbiota del organismo. Además, se trata de un patógeno oportunista de infecciones del tracto digestivo, urinario, respiratorio, e incluso de heridas cutáneas. Ambos tipos bacterianos fueron además elegidos por la relevancia clínica actual que presentan, así como la creciente preocupación asociada al aumento de la resistencia bacteriana por algunas de las especies de sus géneros, como las MRSA o *E. coli* BLEE.

Se decidió emplear unas placas microtituladoras para poder realizar la TL sobre un medio líquido previo a la siembra en cultivos de crecimiento enriquecido como es el agar Sangre. Los medios de cultivo, en especial aquellos destinados a un crecimiento poco selectivo, presentan una difusión térmica muy limitada, a diferencia de lo que ocurre en un líquido o un tejido vivo. Al aplicar la TL sobre un medio, el haz provoca en el punto de irradiación un aumento de la temperatura que podría desencadenar un efecto foto-térmico sobre las bacterias alterando los resultados. Además, se llevó a cabo la medición de la temperatura en un pocillo control donde constatamos que no se produjera un aumento de la temperatura por encima de los 24,5 °C con los parámetros empleados.

La dilución de las muestras madres de ambos tipos microbiológicos hasta 3×10^2 UFC/ml se realizó para poder facilitar el conteo de UFC en las placas cultivadas a partir de los medios irradiados. Para ello, se realizó unos ensayos previos con siembras para

cada una de las escalas de dilución desde 3×10^8 UFC/ml (Escala Nº 1 de McFarland) hasta 3×10 UFC/ml.

Los parámetros de terapia seleccionados para el experimento *in-vitro* pretendieron incluir un rango amplio en cuanto a dosis y longitudes de onda. Para ello se eligió emplear unas dosis de 2, 10 y 20 J/cm² como también emplean otros autores en sus respectivos ensayos *in-vitro*.^{173,281,289} Además, la dosis de 2 J/cm² se empleó en nuestro ensayo *in-vivo* para el Grupo B. En cuanto a las longitudes de onda, se decidió emplear, al igual que en el ensayo *in-vivo*, las cuatro longitudes distintas de las que disponía el equipo láser en cada terapia (660, 800, 905 y 970 nm).

Por otra parte, se decidió emplear de manera comparativa la diferencia que puede existir entre una frecuencia pulsada y una frecuencia continua (CW). Se decidió emplear 50 Hz de frecuencia pulsada por haber sido empleada también en nuestro ensayo *in-vivo*. En cuanto a la densidad de potencia, se empleó de manera constante en todos los grupos experimentales 0,7 W/cm². Esta densidad de potencia es superior a la empleada en el ensayo *in-vivo* aunque la potencia media de terapia fue de 3 W. Esto resultó del ajuste que se realizó en el zoom con el fin de abarcar toda el área de los pocillos irradiados.

5.2.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO *IN-VITRO*

Los resultados obtenidos en nuestro ensayo experimental *in-vitro* mostraron que el grupo 1 (TL de 2 J/cm² con una densidad de potencia media de 3 W y 50 Hz de frecuencia) y la dosis de 2 J/cm² (como parámetro individual) mostraron un incremento relativo de la media de UFC por placa de cultivo con respecto al grupo control (Grupo 5 – placebo) para el *Staphylococcus intermedius*. Por su parte, en el caso de la *E. coli* no se observó ningún resultado significativo, aunque de manera general se apreció un incremento relativo de la media del número de bacterias en los cultivos.

El análisis de los resultados a partir de estudios *in-vitro* muestran más controversias que aquellos realizados *in-vivo*. La falta de parámetros de terapia estandarizados y la gran variedad de patógenos empleados provoca que existan estudios que muestran efectos antibacterianos por parte de la TL^{173,252,262}, y otros que

no muestran efectos, o incluso observen un incremento en la multiplicación bacteriana.^{257,281,292} De esa manera, Bornstein y cols. observaron un efecto bactericida y fungicida por parte de la TL al irradiar cultivos de cuatro tipos microbiológicos distintos, dos bacterianos y otros dos fúngicos.²⁰¹ De manera similar, Krespi y cols. observaron en su ensayo *in-vitro* que utilizando los mismos parámetros de terapia láser se produce una disminución de la supervivencia de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.²⁰² Por el contrario, Dradas y cols. sugiere un efecto proliferativo de *P. aeruginosa* en comparación con el inhibitorio de *S. aureus* cuando aplica la TL bajo las mismas condiciones de tratamiento.²⁰³

Dicho esto, cabe destacar los resultados obtenidos por Nussbaum y cols., quienes observaron que la TL con una dosis de 2 J/cm², asociada a una longitud de onda de 810 nm y 1000 Hz de frecuencia, favorece el crecimiento de *S. aureus*.²⁸¹ Esa terapia, con variaciones en el pulsado, mantiene el crecimiento microbiano salvo para la frecuencia de 292 Hz, donde se produce una reducción no significativa del crecimiento. Además, en ese mismo ensayo, el empleo de dosis de 10 y 20 J/cm² (dosis empleadas también en nuestro ensayo *in-vitro*) está asociado a un incremento del crecimiento de *S. aureus* a diferencia de lo que ocurre en el nuestro. El mismo grupo de trabajo, un año después, comprobó de nuevo que dosis de 2, 10 y 20 J/cm² favorecía la multiplicación de *S. aureus* cuando se aplicaban junto con una longitud de onda de 810 nm, unas densidades de potencia de 0,015 y 0,03 W/cm² y una frecuencia continua.²⁸⁹ Además, observaron mayores efectos en el crecimiento bacteriano para *E. coli* con los mismos parámetros de terapia. Estos resultados son similares a los observados en nuestro ensayo, donde también se observa un incremento relativo de la media no significativo para las dosis de 10 y 20 J/cm², y para la frecuencia continua en la *E. coli*.

Longitudes de onda de 630, 660, 810 y 905 nm también parecen favorecer el crecimiento de *S. aureus* cuando se aplican junto con una densidad de energía de 2 J/cm², mientras que para *E. coli* se observa un efecto inhibitorio a 630 y 905 nm¹⁷³, a diferencia de lo que ocurre en nuestro experimento.

La densidad de potencia empleada en nuestro ensayo (0,7 W/cm²) es mayor a la empleada por estos autores. Una densidad de potencia elevada podría explicar un posible efecto foto-térmico que conllevara una reducción del número de bacterias por aumento de la temperatura de las muestras en los pocillos, para lo cual se realizó el

control de la temperatura previo al ensayo. Además, en ninguna de nuestras terapias se observa un decremento significativo de la media en el número de UFC en comparación con el grupo control que pudiera mostrar este efecto indeseado. Incluso, densidades de potencia superiores a la nuestra (4,5 – 5,6 W/cm²) fueron empleadas por Bornstein y cols. para irradiar cultivos con *S. aureus* y *E. coli* y observar una inhibición en el crecimiento de ambos patógenos no asociada a un aumento fisiológico de la temperatura en los medios.²⁰¹

Nuestros resultados *in-vitro* no parecen corresponder la idea inicial, y sugerida por diversos autores, acerca del mayor efecto sobre las bacterias gram negativas, ya que no solo no se observa una inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* en comparación con *S. intermedius*, sino que, además, para unos parámetros de terapia específicos se observa un incremento no significativo del número de UFC de *E. coli* con respecto al grupo control.

Según estos resultados, y aun siendo propios de nuestro estudio, es necesario plantearse la posibilidad de que el efecto inhibitorio observado en nuestro ensayo *in-vivo* sea secundario a un efecto indirecto sobre las bacterias.

5.3. ANÁLISIS COMPLEMENTARIO

Analizando de manera conjunta los resultados obtenidos en ambos ensayos podemos concluir que, aunque se ha propuesto un efecto inhibitorio directo de la TL sobre las bacterias²⁰⁹, nuestro experimento *in-vitro* no parece confirmar dicha teoría. De esta manera, y con los resultados observados en el ensayo *in-vivo* podemos pensar que existen diferentes fenómenos, como la mejora de la respuesta inmune del paciente, que están regulados por la terapia láser y pueden contribuir a un posible efecto antibacteriano indirecto.

Dentro de los posibles efectos indirectos de la fotobiomodulación cabe destacar el aumento del flujo sanguíneo en las zonas de lesión. Esto favorece la oxigenación de los tejidos provocando ambientes oxigenados donde muchos microorganismos no crecen bien.²¹⁰ El aumento de la circulación además favorecerá la llegada de leucocitos al tejido dañado, en especial de macrófagos y neutrófilos. La activación de los

macrófagos, junto con la producción de los ROS, está descrito por muchos autores como parte del efecto antibacteriano indirecto de la TL.^{167,174,211,212} Además, no se puede descartar un posible efecto sinérgico entre la terapia láser y los antibióticos.²⁹³

La diferencia que existe entre los resultados obtenidos para los grupos de ensayo A (6 J/cm²) y B (2 J/cm²), con respecto al grupo control, parece estar relacionada con la cantidad óptima de densidad de energía que estimula la respuesta inmune del paciente en heridas agudas, donde una dosis de 2 J/cm² parece tener mejores efectos que dosis más altas.²¹⁰ En el ensayo clínico *in-vivo*, tanto en la valoración de heridas como en los recuentos microbiológicos, ambos grupos presentan resultados favorables con respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo donde se emplea una dosis de 2 J/cm² presenta unos resultados estadísticamente significativos en comparación con el grupo donde se emplea una dosis mayor (6 J/cm²).

Uno de los principales factores de limitación de ambos ensayos radica en la heterogeneidad de los parámetros de tratamiento empleados por otros autores cuando los comparamos con los nuestros. Estos parámetros, no solo dependen de la decisión del propio autor, sino también de las limitaciones técnicas de los equipos empleados en cada ensayo, como puedan ser la densidad de potencia media o frecuencias de pulsado entre otras. Además, las características inherentes de un ensayo *in-vitro* limita la extrapolación a estudios *in-vivo*, ya que los estudios *in-vitro* no pueden reproducir la compleja respuesta de los tejidos vivos.

Otros factores limitantes del presente trabajo es el reducido número de pacientes incluidos en el ensayo *in-vivo*, lo cual podría limitar la interpretación de nuestros resultados, así como la falta de un grupo experimental donde no se utilice un tratamiento antibiótico.

Otra posible limitación en nuestro estudio es el hecho de no haber realizado cultivos anaerobios. Las bacterias anaerobias, tienen un importante papel en la infección de heridas y en su evolución clínica. No fueron incluidas en este estudio porque al necesitar unos métodos específicos, no lo pudimos afrontar económicamente. Esto debe ser considerado en futuras investigaciones, al igual que aumentar los tiempos de

evaluación de las heridas y de las muestras microbiológicas, así como del número de pacientes.

Por último, los parámetros de terapia empleados en el estudio *in-vitro* deberían ser utilizados sobre un modelo *in-vivo* con el fin de poder comparar de manera más directa su efecto sobre heridas infectadas en pacientes. En el caso de los resultados *in-vivo*, estos son exclusivos de los parámetros y metodología empleados en el presente trabajo.

6. CONCLUSIONES

1. El empleo de la terapia láser combinando 660, 800, 905 y 970 nm, con una dosis de 2 J/cm^2 y 2 W de potencia media como terapia coadyuvante junto con el antibiótico y un manejo estándar de las heridas contaminadas/infectadas en pacientes caninos, reduce de manera significativa la carga bacteriana de las mismas, con respecto a la no aplicación de la terapia láser. Estos hallazgos no se observan cuando se aplica una dosis de 6 J/cm^2 .
2. El empleo de la terapia láser combinando 660, 800, 905 y 970 nm, con una dosis de 2 J/cm^2 y 2 W de potencia media como terapia coadyuvante junto con el antibiótico y un manejo estándar de las heridas contaminadas/infectadas en pacientes caninos, mejora de manera significativa la puntuación de las heridas según la escala modificada de Falanga y cols.¹ empleada, con respecto a la no aplicación de la terapia láser. Esta mejoría no se observa con una dosis de terapia de 6 J/cm^2 .
3. El empleo de la terapia láser sobre *S. intermedius* favorece un incremento significativo de la media del número de colonias en agar Sangre con respecto al grupo control cuando se aplica con parámetros de terapia de: 2 J/cm^2 , 3 W, 50 Hz y cuatro longitudes de onda simultáneas (660, 800, 905 y 970 nm). Este incremento no se produce para los cultivos de *E. coli*.
4. El empleo de la terapia láser sobre *S. intermedius* favorece un incremento significativo de la media del número de colonias en agar Sangre con respecto al grupo control cuando se aplica con una dosis de 2 J/cm^2 , 3 W y cuatro longitudes de onda simultáneas (660, 800, 905 y 970 nm). Este incremento no se produce de manera significativa para los cultivos de *E. coli*.
5. El análisis conjunto de los resultados de ambos ensayos nos permite establecer que el efecto antimicrobiano observado se debe a un efecto indirecto por parte de la TL cuando se emplea junto con el antibiótico y un manejo estándar de las heridas, siendo la mejora de las condiciones locales de la herida y de la respuesta inmune del organismo las principales responsables de dicho efecto.

7. ANEXOS

7.1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A – Amplitud

ACh – Acetil colina

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ANSI – *American National Standards Institute*

AP-1 – Proteína activadora 1

ARN – Ácido ribonucleico

AS – Agar Columbia sangre

ASLMS – *The American Society for Laser Medicine and Surgery*

AS-Post – Agar Columbia sangre post-tratamiento

AS-Pre – Agar Columbia sangre pre-tratamiento

ATP – Adenosin trifosfato

Ca²⁺ – Calcio

CCO – Citocromo-c-oxidasa

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

COX-2 – Ciclo oxigenasa 2

CO₂ – Dióxido de carbono

CTE – Cadena transportadora de electrones

CW – Frecuencia continua (*Continuous waves*)

DNRO – Distancia nominal de riesgo ocular

EEM – Espectro electromagnético

EE.UU. – Estados Unidos

FCI – *Fédération Cynologique Internationale*

FDA – *Food and drug administration*

f – Frecuencia

g – Factor anisotrópico

Ga-As – Galio-Arsenio

Ga-As-Al – Galio-Arsenio-Aluminio

HCV-UAX – Hospital Clínico Veterinario Universidad Alfonso X “el Sabio”

He-Ne – Helio-Neón

HObR – Hipobromito

HOCl – Hipoclorito

HOI – Hipoyodito

HSP – Proteína de choque térmico

Hz – Hercio

IES – *International Electrotechnical Institute*

ILTA – *International Laser Therapy Association*

ISLAM – *International Society for Laser Applications*

IL-1 β – Interleuquina 1 β

IL-6 – Interleuquina 6

IL-8 – Interleuquina 8

IR – Infrarrojo

J – Julio

JNK – Quinasa Jun N-terminal

LASER – *Light amplification by stimulated emission of radiation*

LEA – Límite de emisión accesible

LEDs – *Light-emitting diode*

LLLT – *Low level laser therapy*

LN – Logaritmo neperiano

MALDI-TOF[®] - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*

MC – Agar MacConkey

MC-Pre – Agar MacConkey pre-tratamiento

MC-Post – Agar MacConkey post-tratamiento

MeSH – *Medical Subject Headings*

mmHg – Milímetro de Mercurio

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

mW – Milivatios

NAALT – *North American Association for Photobiomulation Therapy*

Nd:YAG – Granate de aluminio de itrio dopado de neodimio

NIR – Infrarrojo cercano

NF- κ B – Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NLM – *National Library of Medicine*

nm – Nanómetro

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintasa

NOS_e – Óxido nítrico sintasa isoforma endotelial

NOS_i – Óxido nítrico sintasa isoforma inducida

NOS_n – Óxido nítrico sintasa isoforma nerviosa

NºCol.pre – Número de colonias pre-tratamiento

NºCol.post – Número de colonias post-tratamiento

P_a – Potencia media

P_p – Potencia pico

PBM – Fotobiomodulación (*Photobiomodulation*)

PBS – Tapón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

RIQ – Rango intercuartílico

PRP – Plasma rico en plaquetas

ROS – Especies de oxígeno reactivas (*Reactive oxygen species*)

SIRS – Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SNC – Sistema nervioso central

SNP – Sistema nervioso periférico

SRL – Suero Ringer Lactato

T – Periodo

TL – Terapia láser

TNF α – Factor de necrosis tumoral alfa

UCM – Universidad Complutense de Madrid

UFC – Unidad formadora de colonias

UV – Ultravioleta

WALT – *World Association for Laser Therapy*

WHO – Organización mundial de la salud (*World Health Organization*)

λ – Longitud de onda

7.2. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y DOCUMENTOS ADJUNTOS

Figuras

Figura 1 – Características de una onda electromagnética.

Figura 2 – Espectro electromagnético (EEM).

Figura 3 – Componentes de un equipo láser.

Figura 4 – Fenómenos de dispersión, transmisión, absorción y reflexión de un fotón de luz.

Figura 5 – Gráfico de Montecarlo para la representación de la migración de fotones de luz sobre tejido vivo humano.

Figura 6 – Cartel identificativo de zona de radiaciones láser.

Figura 7 – Cronograma del ensayo clínico para cada paciente.

Figura 8 – Equipo K-Laser K-Cube 4®.

Figura 9 – Representación de los tubos de muestras, sus diluciones y la cantidad de muestra para uno de los medios.

Tablas

Tabla 1 – Terapias láseres programadas para cada tipo de área y dosis.

Tabla 2 – Parámetros de terapia para cada grupo de ensayo.

Tabla 3 – Escala modificada de puntuación de heridas a partir de la establecida por Falanga y cols.¹

Tabla 4 – Parámetros de terapia láser para cada uno de los 5 grupos del ensayo *in-vitro*.

Tabla 5 – Número de pacientes por grupo de ensayo.

Tabla 6 – Distribución de frecuencias en función de las variables clínicas de género, estado reproductor, edad y peso en cada grupo de ensayo.

Tabla 7 – Distribución de frecuencias según la raza en cada grupo de ensayo.

Tabla 8 – Distribución de frecuencias según las variables específicas de la/s herida/s en cada grupo de ensayo.

Tabla 9 – Mediana del área de las heridas incluidas en cada grupo de ensayo.

Tabla 10 – Distribución de frecuencias según las variables específicas del tratamiento para cada grupo de ensayo.

Tabla 11 – Distribución de frecuencias según la presencia de enfermedad concomitante y hospitalización en cada grupo de ensayo.

Tabla 12 – Distribución de la frecuencia según el área de tratamiento/muestreo en cada grupo de ensayo.

Tabla 13 – Unidades formadoras de colonias para cada cultivo y tipo de cultivo en cada paciente.

Tabla 14 – Unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado de área de tratamiento/muestreo para cada cultivo y tipo de cultivo en cada paciente.

Tabla 15 – Número de colonias morfológicamente distintas observadas en los cultivos de agar Sangre pre-tratamiento y post-tratamiento en cada paciente.

Tabla 16 – Número de horas entre la toma de la muestra del cultivo pre-tratamiento y post-tratamiento en cada paciente.

Tabla 17 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar Sangre para las variables clínicas generales de los pacientes.

Tabla 18 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar MacConkey de las variables clínicas generales.

Tabla 19 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar Sangre de las variables específicas de las heridas.

Tabla 20 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar MacConkey para las variables específicas de las heridas.

Tabla 21 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar Sangre para las variables específicas del tratamiento.

Tabla 22 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar MacConkey para las variables específicas del tratamiento.

Tabla 23 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar Sangre para las variables microbiológicas.

Tabla 24 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 72 horas en agar MacConkey para las variables microbiológicas.

Tabla 25 – Análisis multivariables con respecto a las UFC a las 72 horas para los cultivos en agar Sangre para las variables UFC AS-Pre, sumatorio de horas y terapias láser.

Tabla 26 – Análisis multivariable con respecto a las UFC a las 72 horas para los cultivos en agar MacConkey para las variables UFC MC-Pre, sumatorio de horas y terapias láser.

Tabla 27 – Identificación bacteriana de las cepas aisladas en los cultivos de agar sangre pre- y post-tratamiento para cada paciente.

Tabla 28 – Evaluación de las heridas por los evaluadores por paciente y día de ensayo.

Tabla 29 – Puntuaciones medias de las heridas incluidas por grupo de ensayo para los días 0 y 2.

Tabla 30 – Análisis univariable de regresión lineal con respecto a la puntuación de las heridas el día 2 del ensayo para las distintas terapias láser.

Tabla 31 – Número de UFC por placa de siembra para cada una de las muestras irradiadas en cada placa.

Tabla 32 – Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *S. intermedius* para los distintos tipos de terapia láser.

Tabla 33 – Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *E. coli* para los distintos tipos de terapia láser.

Tabla 34 – Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *S. intermedius* para los dos tipos de frecuencias empleados.

Tabla 35 – Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *E. coli* para los dos tipos de frecuencias empleados.

Tabla 36 – Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *S. intermedius* para los distintos tipos de dosis empleados.

Tabla 37 – Modelo univariable de regresión lineal con respecto a las UFC a las 24 horas para los cultivos de *E. coli* para los distintos tipos de dosis empleados.

Documentos adjuntos

Documento adjunto 1 – Consentimiento informado.

Documento adjunto 2 – Documento de recogida de información de los pacientes.

Documento adjunto 1 – Consentimiento informado.

Consentimiento Informado

Servicio de Cirugía de Pequeños Animales del HCV UAX
 Servicio de Microbiología y Parasitología del HCV
 Complutense

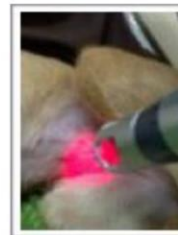
Nombre:

NHC:

Microbiología de heridas infectadas con y sin el uso de láser terapéutico (K-Laser®) en pacientes caninos de hospitales veterinarios universitarios. Ensayo clínico.

La aplicación de terapia láser para favorecer el proceso de cicatrización ha sido demostrada por numerosos estudios clínicos. La luz láser ha demostrado su efectividad en la mejora de la curación de heridas abiertas, en la reducción del dolor y en la disminución del riesgo de infección. La terapia láser es empleada en el tratamiento de úlceras, quemaduras, heridas infectadas, traumáticas y postquirúrgicas, mejorando la cicatrización y acortando el tiempo de recuperación.

En los casos de heridas potencialmente infectadas o contaminadas está indicado realizar un cultivo y antibiograma para plantear el posible tratamiento antibiótico correcto y evitar de este modo las resistencias microbianas. La actual preocupación a dicha resistencia nos conduce a buscar nuevos métodos de tratamiento en los que incluiríamos la terapia láser.



En este estudio pretendemos determinar cómo afecta la aplicación del láser terapéutico a la microbiota colonizadora de heridas de la piel de su mascota.

Su mascota recibirá un tratamiento láser en 2 sesiones separadas 24 horas. Las muestras se tomarán antes de la primera sesión y 24 horas después de la segunda. La recolección de la muestra se realizará con la ayuda de un hisopo estéril por las diferentes superficies a tratar y serán inmediatamente transportados al laboratorio. Dicho procedimiento no es invasivo y no comporta sufrimiento o riesgo para el animal. La única precaución a tener en cuenta durante la terapia láser es no enfocar la luz a los ojos de su mascota. La pieza de mano del láser no contacta con la piel y no produce ningún efecto térmico molesto.



Este tipo de estudio, denominado ensayo clínico, se realiza también en Medicina Humana y su objetivo es mejorar la atención que se proporciona a cada paciente.

Usted es completamente libre de decidir si su mascota participa o no en el estudio. Su decisión no influirá en la atención veterinaria que su perro recibirá.

El estudio cubrirá los gastos “humanos” asociados al manejo de la herida incluyendo todas las consultas de revisión. Además, contará con descuentos en distintas pruebas de diagnóstico. Usted como propietario recibirá dos presupuestos detallados donde podrá ver el coste aproximado asociado a la participación o no en dicho estudio.

En caso de aceptar la participación, debe saber que algunos datos sobre su mascota serán utilizados para el estudio, pero no se compartirán datos sobre su propietario, que se mantendrán estrictamente confidenciales.

Si tiene alguna pregunta, no dude en consultarnos y se la aclararemos.

Por tanto:

Se solicita a D/Dñacon
DNI:....., propietario del perro arriba indicado, conceda su consentimiento para ser incluido en el estudio, tras haber leído y entendido la información arriba indicada.

Villanueva de la cañada, a.....de.....de 2017

Fdo:

Documento adjunto 2 – Documento de recogida de información de los pacientes.

Anamnesis y reseña del paciente con herida/s

- Nombre del paciente:
 - NHC:
 - Raza:
 - Edad:
 - Sexo:

- Nombre del propietario:
 - Teléfono:
 - Email:
 - Dirección:

- Anamnesis:
 - Enfermedad/es:
 - Tratamiento actual:
 - Sintomatología clínica:
 - Exploración física:

- Herida:
 - Causa:
 - Fecha origen:
 - Fecha y hora 1ª consulta:
 - Fecha y hora 2ª consulta:
 - Fecha y hora 3ª consulta:
 - Consultas revisión:

- Pruebas complementarias:
 - Analítica sanguínea:
 - Radiografías:
 - Ecografía:
 - Cultivo:

- Tratamiento:
 - Manejo de herida:

 - Terapia láser:

 - Médico:

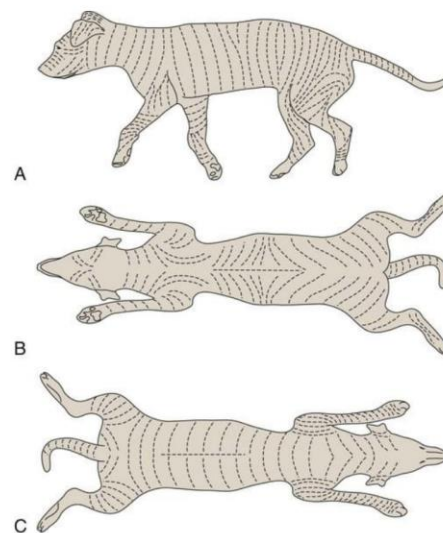
Herida/s

- Etiología:
 - En caso de ataque por otro perro:
 - o Raza del atacante
 - o ¿Ha sufrido heridas el atacante?
 - o ¿Ha sufrido ataques previos?
 - ¿Dónde ha ocurrido?
 - ¿Cuándo ha ocurrido?
 - Número y localización de la/s herida/s (mapa anatómico)
 - Clasificación de la/s herida/s

- Tamaño de la/s herida/s

- Manejo de la/s herida/s

Parámetro clínico	2	1	0
Cantidad de exudado	alto o de tipo purulento	moderado	bajo o nulo
Edema o hinchazón herida	severo	moderado	bajo o nulo
Dermatitis en piel periférica	severo	moderado	bajo o nulo
Hematoma	severo	moderado	mínimo o nulo
Tejido necrótico o viabilidad comprometida	presente >25%	0-25%	ausente
Cultivo bacteriano	positivo		negativo



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Falanga V, Saap LJ, Ozonoff A. Wound bed score and its correlation with healing of chronic wounds. *Dermatol Ther*. 2006;19(6):383-390.
2. Pryor B, Millis DL. Therapeutic Laser in Veterinary Medicine. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 2015;45(1):45-56.
3. Renwick SM, Renwick AI, Brodbelt DC, et al. Influence of class IV laser therapy on the outcomes of tibial plateau leveling osteotomy in dogs. *Vet Surg*. 2018;47(4):507-515.
4. Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, et al. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Aust J Physiother*. 2003;49(2):107-116.
5. Posten W, Wrone DA, Dover JS, et al. Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and efficacy. *Dermatologic Surg*. 2005;31(3):334-340.
6. Chung H, Dai T, Sharma SK, et al. The nuts and bolts of low-level laser (Light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516-533.
7. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015;33(4):183-184.
8. Hall RN, Fenner GE, Kingsley JD, et al. Coherent Light Emission from GaAs Junctions. *Essentials of Lasers*. 1969;366(c):186-191.
9. McGuff PE, Deterling RA, Gottlieb LS, et al. The laser treatment of experimental malignant tumours. *Can Med Assoc*. 1964;91(21):1089-1095.
10. Mester E. Effect of laser on hair growth of mice. *Kiserl Orvostud*. 1967;19:628-631.
11. Mester E, Spiry T, Szende B, et al. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg*. 1971;122(4):532-535.
12. Mester A, Mester A. The History of Photobiomodulation: Endre Mester (1903–1984). *Photomed Laser Surg*. 2017;35(8):393-394.
13. Zhou YC. An advanced clinical trial with laser acupuncture anesthesia for minor operations in the oro-maxillofacial region. *Lasers Surg Med*. 1984;4(3):297-303.
14. Baxter GD, Bleakley C, McDonough S. Clinical effectiveness of laser acupuncture: A systematic review. *JAMS J Acupunct Meridian Stud*. 2008;1(2):65-82.
15. Law D, McDonough S, Bleakley C, et al. Laser Acupuncture for Treating Musculoskeletal Pain: A Systematic Review with Meta-analysis. *JAMS J Acupunct Meridian Stud*. 2015;8(1):2-16.
16. Calderhead RG. Watts a joule: on the importance of accurate and correct reporting of laser parameters in low reactive-level laser therapy and photobioactivation research. *Las*. 1991;3(4):177-182.

17. Gould GR. The LASER, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. In: n.d.; 1959:15-18.
18. Fonseca AS, Moreira TO, Paixão DL, et al. Effect of laser therapy on DNA damage. *Lasers Surg Med.* 2010;42(6):481-488.
19. Craford MG, Holonyak N, Kish FA. In pursuit of the ultimate lamp. *Sci Am.* 2001;284(2):62-67.
20. Zheludev N. The life and times of the LED — a 100-year history. *Nat Photonics.* 2007;1(4):189-192.
21. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan med Surg.* 2013;32(1):41-52.
22. Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, et al. Clinical and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(2):121-128.
23. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Baroni BM, et al. Comparison Between Single-Diode Low-Level Laser Therapy (LLLT) and LED Multi-Diode (Cluster) Therapy (LEDT) Applications Before High-Intensity Exercise. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(4):617-623.
24. Henderson AR, Schulmeister K. Eye protection. In: *Laser Safety.* ; 2004:403-419.
25. Bjordal JM. Low Level Laser Therapy (LLLT) and World Association for Laser Therapy (WALT) Dosage Recommendations. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(2):61-62.
26. WALT WA of LT. Consensus Agreement on the Design and Conduct of Clinical Studies with Low-Level Laser Therapy and Light Therapy for Musculoskeletal Pain and Disorders. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):759-760.
27. Riegel RJ, Godbold JC. Fundamental Information. In: *Laser Therapy in Veterinary Medicine: Photobiomodulation.* John Wiley. ; 2017:9-18.
28. Shirkavand A, Sarkar S, Hejazi M, et al. A new Monte Carlo code for absorption simulation of laser-skin tissue interaction. *Chin Opt Lett.* 2007;5(4):238-240.
29. Fang Q, Boas DA. Monte Carlo Simulation of Photon Migration in 3D Turbid Media Accelerated by Graphics Processing Units. *Opt Express.* 2009;17(22):20178.
30. Smith KC. the Photobiological Basis of Low Level Laser Radiation Therapy. *Laser Ther.* 1991;3(1):19-24.
31. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2014;140:344-358.
32. Xu Y, Lin Y, Gao S, Shen J. Study on mechanism of release oxygen by photo-excited hemoglobin in low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2017;33(1):135-139.
33. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1999;49(1):1-17.

34. Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low level light therapy. *Proc SPIE*. 2006;6140(614001):1-12.
35. Peplow P V, Chung T, Baxter GD. Laser Photobiomodulation of Wound Healing : *Photomed Laser Surg*. 2010;28(3):291-325.
36. Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1056:486-493.
37. Karu TI, Pyatibrat L V., Kalendo GS. Cell attachment modulation by radiation from a pulsed light diode ($\lambda = 820 \text{ nm}$) and various chemicals. *Lasers Surg Med*. 2001;28(3):227-236.
38. Karu T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(2):159-160.
39. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with HeNe laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1995;27(3):219-223.
40. Da Silva F, De Oliveira R, Ferreira M. Effects of low-level laser therapy on wound healing. *Rev Col Bras Cir*. 2014;41(2):129-133.
41. Chen ACH, Arany PR, Huang YY, et al. Low-Level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*. 2011;6(7):1-8.
42. Sharma SK, Kharkwal GB, Sajo M, et al. Dose response effects of 810nm laser light on mouse primary cortical neurons. *Lasers Surg Med*. 2011;43(8):851-859.
43. Ayuk SM, Houreld NN, Abrahamse H. Collagen Production in Diabetic Wounded Fibroblasts in Response to Low-Intensity Laser Irradiation at 660 nm. *Diabetes Technol Ther*. 2012;14(12):1110-1117.
44. Karu TI, Kolyakov SF. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(4):355-361.
45. Farivar S, Malekshahi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. *J lasers Med Sci*. 2014;5(2):58-62.
46. Lane N. Cell biology: Power games. *Nature*. 2006;443(7114):901-903.
47. Passarella S, Casamassima E, Molinari S, et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria by HeNe laser. *FEBS Lett*. 1984;175(1):95-99.
48. Novak I. ATP as a Signaling Molecule: the Exocrine Focus. *Physiology*. 2003;18(1):12-17.
49. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, et al. Biphasic dose response in low level lighththerapy. *Dose-Response*. 2009;7(4):358-383.
50. Huang YY, Nagata K, Tedford CE, et al. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. *J Biophotonics*. 2012;6(10):829-838.

51. Giuliani A, Lorenzini L, Gallamini M, et al. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: Effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. *BMC Complement Altern Med*. 2009;9:1-10.
52. Lim WB, Kim JS, Ko YJ, et al. Effects of 635nm light-emitting diode irradiation on angiogenesis in CoCl₂-exposed HUVECs. *Lasers Surg Med*. 2011;43(4):344-352.
53. Huang YY, Nagata K, Tedford CE, et al. Low-level laser therapy (810 nm) protects primary cortical neurons against excitotoxicity in vitro. *J Biophotonics*. 2014;7(8):656-664.
54. Silveira PCL, Silva LA da, Fraga DB, et al. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2007;95(2):89-92.
55. Hu WP, Wang JJ, Yu CL, et al. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J Invest Dermatol*. 2007;127(8):2048-2057.
56. Glennon-Alty L, Hackett AP, Chapman EA, et al. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. *Free Radic Biol Med*. 2018;125:25-35.
57. Lei X, Liu B, Huang Z, et al. A clinical study of photodynamic therapy for chronic skin ulcers in lower limbs infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Dermatol Res*. 2015;307(1):49-55.
58. Kolarova H, Nevrelouva P, Tomankova K, et al. Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizers. *Gen Physiol Biophys*. 2008;27(2):101-105.
59. Callaghan GA, Riordan C, Gilmore WS, et al. Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation alter DNA synthesis in the haemopoietic cell line U937. *Lasers Surg Med*. 1996;19(2):201-206.
60. Oren DA, Charney DS, Lavie R, et al. Stimulation of reactive oxygen species production by an antidepressant visible light source. *Biol Psychiatry*. 2001;49(5):464-467.
61. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med*. 1998;22(5):281-287.
62. Lubart R, Eichler M, Lavi R, et al. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(1):3-9.
63. Tafur J, Mills PJ. Low-Intensity Light Therapy: Exploring the Role of Redox Mechanisms. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(4):323-328.
64. Zhang J, Xing D, Gao X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2008;217(2):518-528.

65. Lubart R, Levinshal T, Cohen N, et al. Changes in Calcium Transport in Mammalian Sperm Mitochondria and Plasma Membrane due to 633 nm and 780 nm Irradiation. *Laser der Medizin / Laser Med.* 1997;499(July):449-453.
66. Larkin KA, Cat C, Martin JS, et al. Limb Blood Flow After Class 4 Laser Therapy. *J Athl Train.* 2012;47(2):178-183.
67. Pinheiro ALB, Soares LGP, Marques AMC, et al. Raman ratios on the repair of grafted surgical bone defects irradiated or not with laser (λ 780 nm) or LED (λ 850 nm). *J Photochem Photobiol B Biol.* 2014;138:146-154.
68. Oliveira P, Sperandio E, Fernandes KR, et al. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev Bras Fisioter.* 2011;15(3):200-205.
69. Marquez de Martinez ME, Barbosa Pinheiro AL, de Assis Limeira, Jr. F, et al. Assessment of bone repair associated to the use of organic bovine bone and membrane irradiated with 830nm. *Lasers Dent IX.* 2005;4950(4):156.
70. Soares LGP, de Magalhães Júnior EB, Magalhães CAB, et al. New bone formation around implants inserted on autologous and xenografts irradiated or not with IR laser light: A histomorphometric study in rabbits. *Braz Dent J.* 2013;24(3):218-223.
71. Santinoni C dos S, Oliveira HFF, Batista VE de S, et al. Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;169:83-89.
72. Bayat M, Jalalifirouzkouhi A. Presenting a Method to Improve Bone Quality Through Stimulation of Osteoporotic Mesenchymal Stem Cells by Low-Level Laser Therapy. *Photomed Laser Surg.* 2017;35(11):622-628.
73. Gigo-Benato D, Geuna S, De Castro Rodrigues A, et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: A double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med Sci.* 2004;19(1):57-65.
74. Alessi Pissulin CN, Henrique Fernandes AA, Sanchez Orellana AM, et al. Low-level laser therapy (LLLT) accelerates the sternomastoid muscle regeneration process after myonecrosis due to bupivacaine. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;168:30-39.
75. Alves AN, Fernandes KPS, Deana AM, et al. Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: A systematic review. *Am J Phys Med Rehabil.* 2014;93(12):1073-1085.
76. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006;38(1):74-83.
77. Wu X, Alberico S, Saidu E, et al. Organic light emitting diode improves diabetic cutaneous wound healing in rats. *Wound Repair Regen.* 2015;23(1):104-114.

78. Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, et al. Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(2):102-106.
79. Sperandio FF, Simoes A, Correa L, et al. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. *J Biophotonics.* 2015;8(10):795-803.
80. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: A meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(3):241-247.
81. Schäfers M, Geis C, Svensson CI, et al. Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci.* 2003;17(4):791-804.
82. Covey WC, Ignatowski TA, Renauld AE, et al. Expression of neuron-associated tumor necrosis factor alpha in the brain is increased during persistent pain. *Reg Anesth Pain Med.* 2002;27(4):357-366.
83. Üçeyler N, Sommer C. Cytokine-Induced Pain: Basic Science and Clinical Implications. *Rev Analg.* 2008;9(2):87-103.
84. Parke AL, Lui PT, Parke DV. Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Inflammopharmacology.* 2003;11(1):87-95.
85. Fernandes KPS, Alves AN, Nunes FD, et al. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):1043-1046.
86. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, et al. Cytokine mRNA Expression Is Decreased in the Subplantar Muscle of Rat Paw Subjected to Carrageenan-Induced Inflammation after Low-Level Laser Therapy. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):19-24.
87. Bortone F, Santos HA, Albertini R, et al. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(2):206-210.
88. Prianti ACG, Silva JA, Dos Santos RF, et al. Low-level laser therapy (LLLT) reduces the COX-2 mRNA expression in both subplantar and total brain tissues in the model of peripheral inflammation induced by administration of carrageenan. *Lasers Med Sci.* 2014;29(4):1397-1403.
89. Alves ACA, Vieira RDP, Leal-Junior ECP, et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R116.
90. Dos Santos SA, Alves ACA, Leal ECP, et al. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Lasers Med Sci.* 2013;29(3):1051-1058.

91. Pereira FC, Parisi JR, Maglioni CB, et al. Antinociceptive effects of low-level laser therapy at 3 and 8 j/cm² in a rat model of postoperative pain: possible role of endogenous Opioids. *Lasers Surg Med*. 2017;49(9):844-851.
92. Walker J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. *Neurosci Lett*. 1983;43:339-344.
93. Cidral-Filho FJ, Mazzardo-Martins L, Martins DF, et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the L-arginine/nitric oxide pathway. *Lasers Med Sci*. 2013;29(2):695-702.
94. Chow R, Armati P, Bjordal JM, et al. Inhibitory Effects of Laser Irradiation on Peripheral Mammalian Nerves and Relevance to Analgesic Effects: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(6):365-381.
95. Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers Med Sci*. 2014;29(1):351-357.
96. Hsieh YL, Chou LW, Chang PL, et al. Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: Possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). *J Comp Neurol*. 2012;520(13):2903-2916.
97. Wong-Riley MTT, Liang HL, Eells JT, et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4761-4771.
98. Nicolau RA, Martinez MS, Rigau J, et al. Effect of Low Power 655 nm Diode Laser Irradiation on the Neuromuscular Junctions of the Mouse Diaphragm. *Lasers Surg Med*. 2004;34(3):277-284.
99. Nicolau RA, Martinez MS, Rigau J, et al. Neurotransmitter release changes induced by low power 830 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse. *Lasers Surg Med*. 2004;35(3):236-241.
100. Mitchell UH, Mack GL. Low-Level Laser Treatment with Near-Infrared Light Increases Venous Nitric Oxide Levels Acutely. *Am J Phys Med Rehabil*. 2013;92(2):151-156.
101. SamoiloVA KA, Zhevago NA, Petrishchev NN, et al. Role of Nitric Oxide in the Visible Light-Induced Rapid Increase of Human Skin Microcirculation at the Local and Systemic Levels: II. Healthy Volunteers. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(5):443-449.
102. Jamtvedt G, Dahm KT, Christie A, et al. Physical Therapy Interventions for Patients With Osteoarthritis of the Knee: An Overview of Systematic Reviews. *Phys Ther*. 2007;88(1):123-136.
103. Gur A, Sarac AJ, Cevik R, et al. Efficacy of 904 nm Gallium Arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: A double-blind and randomize-controlled trial. *Lasers Surg Med*. 2004;35(3):229-235.

104. Van Middelkoop M, Rubinstein SM, Kuijpers T, et al. A systematic review on the effectiveness of physical and rehabilitation interventions for chronic non-specific low back pain. *Eur Spine J*. 2011;20(1):19-39.
105. Doyle AT, Lauber C, Sabine K. The Effects of Low-Level Laser Therapy on Pain Associated with Tendinopathy: A Critically Appraised Topic. *J Sport Rehabil*. 2015;25(1):83-90.
106. Tsai WC, Hsu CC, Pang JHS, et al. Low-level laser irradiation stimulates tenocyte migration with up-regulation of dynamin II expression. *PLoS One*. 2012;7(5):1-7.
107. Tsai WC, Cheng JW, Chen JL, et al. Low-level laser irradiation stimulates tenocyte proliferation in association with increased NO synthesis and upregulation of PCNA and cyclins. *Lasers Med Sci*. 2014;29(4):1377-1384.
108. Ahmed OF, Elkharbotly AM, Taha N, et al. Treatment of mild to moderate carpal tunnel syndrome in patients with diabetic neuropathy using low level laser therapy versus ultrasound controlled comparative study. *BBA Clin*. 2017;8(July):43-47.
109. de Andrade ALM, Bossini PS, do Canto De Souza ALM, et al. Effect of photobiomodulation therapy (808 nm) in the control of neuropathic pain in mice. *Lasers Med Sci*. 2017;32(4):865-872.
110. Boy F, Ozkan FU, Aktas I, et al. New treatment alternatives in the ulnar neuropathy at the elbow: ultrasound and low-level laser therapy. *Acta Neurol Belg*. 2014;115(3):355-360.
111. Dastanpour S, Beitollahi JM, Saber K. The effect of low-level laser therapy on human leukemic cells. *J Lasers Med Sci*. 2015;6(2):74-79.
112. Gomes Henriques AC, Ginani F, Oliveira RM, et al. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Lasers Med Sci*. 2014;29(4):1385-1395.
113. Cialdai F, Landini I, Capaccioli S, et al. In vitro study on the safety of near infrared laser therapy in its potential application as postmastectomy lymphedema treatment. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015;151:285-296.
114. Myakishev-Rempel M, Stadler I, Brondon P, et al. A Preliminary Study of the Safety of Red Light Phototherapy of Tissues Harboring Cancer. *Photomed Laser Surg*. 2012;30(9):551-558.
115. Monteiro JS, Pinheiro ALB, de Oliveira SCPS, et al. Influence of Laser Phototherapy (λ 660 nm) on the Outcome of Oral Chemical Carcinogenesis on the Hamster Cheek Pouch Model: Histological Study. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(11):741-745.
116. Oliveira SP de, Rahal SC, Pereira EJ, et al. Low-level laser on femoral growth plate in rats. *Acta Cir Bras*. 2012;27(2):117-122.

117. Azevedo LH, Corraearanha AC, Stolf SF, et al. Evaluation of Low Intensity Laser Effects on the Thyroid Gland of Male Mice. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(6):567-570.
118. Massotti FP, Gomes FV, Mayer L, et al. Histomorphometric Assessment of the Influence of Low-Level Laser Therapy on Peri-Implant Tissue Healing in the Rabbit Mandible. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(3):123-128.
119. De Vasconcellos LMR, Barbara MAM, Deco CP, et al. Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAIs): A histomorphometric study in rats. *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):575-580.
120. Boldrini C, De Almeida JM, Fernandes LA, et al. Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone-titanium implant interface. *Lasers Med Sci.* 2013;28(1):349-352.
121. Salman R, Bakhshi S, Jannat F, et al. Effect of 830-nm diode laser irradiation on human sperm motility. *Lasers Med Sci.* 2014;29(1):97-104.
122. Taha MF, Valojerdi MR. Quantitative and Qualitative Changes of the Seminiferous Epithelium Induced by GaAIs (830 nm) Laser Radiation. *Lasers Surg Med.* 2004;34(4):352-359.
123. Meirelles GCS, Santos JN, Chagas PO, et al. A Comparative Study of the Effects of Laser Photobiomodulation on the Healing of Third-Degree Burns: A Histological Study in Rats. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(2):159-166.
124. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, et al. CDC Definitions of Nosocomial Surgical Site Infections, 1992: A Modification of CDC Definitions of Surgical Wound Infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1992;13(10):606-608.
125. Anderson D. Wound management in small animal practice. *In Pract.* 1996;18(3):115-128.
126. Percival NJ. Classification of Wounds and their Management. *Surg.* 2003;20(5):114-117.
127. Moreira ME, Markovchick VJ. Wound Management. *Emerg Med Clin North Am.* 2007;25(3):873-899.
128. Owens CD, Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *J Hosp Infect.* 2008;70(SUPPL. 2):3-10.
129. Kolata RJ, Kraut NH, Johnson DE. Patterns of trauma in urban dogs and cats: a study of 1000 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1974;164:499-502.
130. Waldron R, Zimmerman-Pope N. Superficial skin wounds. In: Slatter D, ed. *Textbook of Small Animal Surgery.* Elsevier; 2003:259-273.
131. Shamir MH, Leisner S, Klement E, et al. Dog Bite Wounds in Dogs and Cats: a Retrospective Study of 196 Cases. *J Vet Med Ser A.* 2002;49(2):107-112.
132. Holt DE, Griffin G. Bite wounds in dogs and cats. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2000;30(3):669-679.

133. Peña-Villalobos I, Lois P, Casanova-Maldonado I, et al. Hyperbaric Oxygen Increases Stem Cell Proliferation, Angiogenesis and Wound-Healing Ability of WJ- MSCs in Diabetic Mice. *Front Physiol.* 2018;9(July):1-15.
134. Ahmadi AR, Chicco M, Huang J, et al. Stem cells in burn wound healing: A systematic review of the literature. *Burns.* 2018:1-10.
135. Kim JH, Park C, Park HM. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol.* 2009;20(2):123-126.
136. Link KA, Koenig JB, Silveira A, et al. Therapy on Growth Factor Gene Expression in Wounds and Intact Skin of Horses. *Am J Vet Res.* 2013;74(2).
137. Kloth LC, McCulloch JM. Promotion of wound healing with electrical stimulation. *J Prev Heal Adv Wound Care.* 1996;9(5):42-45.
138. Bogie KM, Reger SI, Levine SP, et al. Electrical Stimulation for Pressure Sore Prevention and Wound Healing. *Assist Technol.* 2000;12(1):50-66.
139. Leung MC, Ng GY, Yip K. Effect of ultrasound on acute inflammation of transected medial collateral ligaments. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004;85(6):963-966.
140. Stanley BJ. Negative Pressure Wound Therapy. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2017;47(6):1203-1220.
141. Nolff MC, Albert R, Reese S, et al. Comparison of Negative Pressure Wound Therapy and Silver-Coated Foam Dressings in Open Wound Treatment in Dogs: A Prospective Controlled Clinical Trial. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2018;31(4):229-238.
142. Hekmatpou D, Mehrabi F, Rahzani K, et al. The effect of aloe vera clinical trials on prevention and healing of skin wound: A systematic review. *Iran J Med Sci.* 2019;44(1):1-9.
143. Kotian S, Sushma K, Kumar B, et al. The Role of Natural Medicines on Wound Healing : A Biomechanical , Histological , Biochemical and Molecular Study. *Ethiop J Health Sci.* 2018;28(6): 759-770.
144. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, et al. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* 2014;116(1):1-7.
145. Godine RL. Low Level Laser Therapy (LLLT) in Veterinary Medicine. *Photomed Laser Surg.* 2013;32(1):1-2.
146. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Heal Phys.* 1989;56(5):691-704.
147. Herascu N, Velciu B, Calin M, et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) Efficacy in Post-operative Wounds. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):70-73.
148. Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N, et al. Effect of low-level laser therapy on the healing of second-degree burns in rats: A histological and microbiological study. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2005;78(2):171-177.

149. Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, et al. The Efficacy of Low-Power Lasers in Tissue Repair and Pain Control: A Meta-Analysis Study. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(4):323-329.
150. Akram Z, Vohra F, Javed F. Low-level laser therapy as an adjunct to connective tissue graft procedure in the treatment of gingival recession defects: A systematic review and meta-analysis. *J Esthet Restor Dent.* 2018;30(4):299-306.
151. Ribeiro MAG, Albuquerque RLC, Ramalho LMP, et al. Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(1):49-55.
152. Bjordal JM, Lopes-Martins RAB, Iversen V V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J Sports Med.* 2006;40(1):76-80.
153. Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):71-78.
154. Aimbire F, Bjordal JM, Iversen V V., et al. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor α -mediated smooth airway muscle dysfunction. *Lasers Surg Med.* 2006;38(8):773-778.
155. Núñez SC, França CM, Silva DFT, et al. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. *Lasers Med Sci.* 2013;28(2):633-641.
156. Rocha AM, De Oliveira RG, Farias RE, et al. Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. *An Bras Dermatol.* 2006;81(2):150-156.
157. Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau RA, et al. Comparison between Wound Healing in Induced Diabetic and Nondiabetic Rats after Low-Level Laser Therapy. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(4):474-479.
158. Safavi SM, Kazemi B, Esmaili M, et al. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med Sci.* 2008;23(3):331-335.
159. Stadler I, Lanzafame RJ, Evans R, et al. 830-Nm Irradiation Increases the Wound Tensile Strength in a Diabetic Murine Model. *Lasers Surg Med.* 2001;28(3):220-226.
160. Freitas AC, Pinheiro AL, Miranda P, et al. Assessment of anti-inflammatory effect of 830nm laser light using C-reactive protein levels. *Braz Dent J.* 2001;12(3):187-190.
161. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(1):49-59.

162. Maiya GA, Kumar P, Rao L. Effect of Low Intensity Helium-Neon (He-Ne) Laser Irradiation on Diabetic Wound Healing Dynamics. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(2):187-190.
163. Ribeiro MS, Da Silva DDF, De Araújo CEN, et al. Effects of Low-Intensity Polarized Visible Laser Radiation on Skin Burns: A Light Microscopy Study. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22(1):59-66.
164. Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, et al. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: A triple-blind, sham-controlled study. *J Athl Train.* 2004;39(3):223-229.
165. Wood VT, Pinfildi CE, Neves MAI, et al. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med.* 2010;42(6):559-565.
166. Calisto FCF da S, Calisto SL da S, Souza AP de, et al. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. *Acta Cir Bras.* 2015;30(3):204-208.
167. Medrado AR a P, Pugliese LS, Reis SR, et al. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2003;32(3):239-244.
168. Yu HS, Chang KL, Yu CL, et al. Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 α and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996;107(4):593-596.
169. Yu HS, Wu CS, Yu CL, et al. Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2003;120(1):56-64.
170. Gagnon D, Gibson TWG, Singh A, et al. An in vitro method to test the safety and efficacy of low-level laser therapy (LLLT) in the healing of a canine skin model. *BMC Vet Res.* 2017;12(1):73.
171. Negut I, Grumezescu V, Grumezescu AM. Treatment Strategies for Infected Wounds. 2018:1-23.
172. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available from: <https://tinyurl.com/kmva5da>. Published 2017 February 27.
173. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm Laser Irradiation Delivering Radiant Exposure of 1-50 J/cm² on Three Species of bacteria in Vitro. *J Clin Laser Med Surg.* 2002;20(6):325-333.
174. Krespi YP, Kizhner V. Laser-assisted nasal decolonization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg.* 2012;33(5):572-575.
175. Cardona AF, Wilson SE. Skin and Soft-Tissue Infections: A Critical Review and the Role of Telavancin in Their Treatment. *Clin Infect Dis.* 2015;61(Suppl2):S69-S78.

176. Bowler P, Duerden BI, Armstrong DG. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(April):244-269.
177. Pavletic MM, Trout NJ. Bullet, Bite, and Burn Wounds in Dogs and Cats. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2006;36(4):873-893.
178. Smith PF, Meadowcroft AM, May DB. Treating mammalian bite wounds. *J Clin Pharm Ther.* 2000;25(2):85-99. doi:10.1046/j.1365-2710.2000.00274.x
179. Smith BA, Hosgood G, Hedlund CS. Omental pedicle used to manage a large dorsal wound in a dog. *J Small Anim Pract.* 1995;36(6):267-270.
180. Cole MR, Hobden JA, Warner IM. Recycling antibiotics into GUMBOS: A new combination strategy to combat multi-drug-resistant bacteria. *Molecules.* 2015;20(4):6466-6487.
181. Sheets AR, Demidova-Rice TN, Shi L, et al. Identification and characterization of novel matrix-derived bioactive peptides: A role for collagenase from Santyl® ointment in post-debridement wound healing? *PLoS One.* 2016;11(7):1-22.
182. Singer AJ, Taira BR, Anderson R, et al. Reepithelialization of mid-dermal porcine burns after rapid enzymatic debridement with Debrase®. *J Burn Care Res.* 2011;32(6):647-653.
183. Mancini S, Cuomo R, Poggialini M, et al. Autolytic debridement and management of bacterial load with an occlusive hydroactive deressing impregnated with polyhexamethylene biguanide. *Acta Biomed.* 2017;88(4):409-413.
184. Gustinelli-Barbosa MA, Paggiaro AO, De Carvalho VF, et al. Effects of hydrogel with enriched sodium alginate in wounds of diabetic patients. *Plast Surg Nurs.* 2018;38(3):133-138.
185. Cuschieri L, Debosz J, Miiller P, et al. Autolytic debridement of a large, necrotic, fully occluded foot ulcer using a hydrocolloid dressing in a diabetic patient. *Adv Ski Wound Care.* 2013;26(7):300-304.
186. Michael KA, Daniel DJ, James CJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):423-435.
187. Dissemond J, Augustin M, Eming SA, et al. Modern wound care - Practical aspects of non-interventional topical treatment of patients with chronic wounds. *JDDG - J Ger Soc Dermatology.* 2014;12(7):541-555.
188. Das S, Dasgupta A, Chopra S. Drug repurposing: A new front in the war against *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2016;11(8):1091-1099.
189. Partoazar A, Kianvash N, Darvishi MH, et al. Ethosomal Curcumin Promoted Wound Healing and Reduced Bacterial Flora in Second Degree Burn in Rat. *Drug Res (Stuttg).* 2016;66(12):660-665.
190. Aumeeruddy-Elalfi Z, Ismaël IS, Hosenally M, et al. Essential oils from tropical medicinal herbs and food plants inhibit biofilm formation in vitro and are non-cytotoxic to human cells. *3 Biotech.* 2018;8(9).

191. Aumeeruddy-Elalfi Z, Lall N, Fibrich B, et al. Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and extracellular antimelanogenic properties in vitro. *J Food Drug Anal.* 2018;26(1):232-243.
192. Sumer Z, Yildirim G, Sumer H, et al. Citotoxic and antibacterial activity of the mixture of olive oil and lime cream in invitro conditions. *J Tradit Complement Altern Med.* 2013;10(4):137-143.
193. Bulman SEL, Tronci G, Goswami P, et al. Antibacterial properties of nonwoven wound dressings coated with Manuka honey or methylglyoxal. *Materials (Basel).* 2017;10(8).
194. Saikaly SK, Khachemoune A. Honey and Wound Healing : An Update. *Am J Clin Dermatol.* 2017;18(2):237-251.
195. Mekkawy AI, El-Mokhtar MA, Nafady NA, et al. In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: Effect of surface coating and loading into hydrogels. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:759-777.
196. Sau TK, Goia D V. Biomedical Applications of Gold Nanoparticles. *Fine Particles in Medicine and Pharmacy.* 2011.
197. Cao Y, Gong Y, Liao W, et al. A review of cardiovascular toxicity of TiO₂ , ZnO and Ag nanoparticles (NPs). *BioMetals.* 2018;31(4):457-476.
198. Yang Q, Chen S, Shi H, et al. In vitro study of improved wound-healing effect of bioactive borate-based glass nano-/micro-fibers. *Mater Sci Eng C.* 2015;55:105-117.
199. Pickles SF, Pritchard DI. Quality control of a medicinal larval (*Lucilia sericata*) debridement device based on released gelatinase activity. *Med Vet Entomol.* 2017;31(2):200-206.
200. Armstrong DG, Mossel J, Short B, et al. Maggot debridement therapy. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2002;92(7):398-401.
201. Bornstein E, Hermans W, Gridley S, et al. Near-infrared photoinactivation of bacteria and fungi at physiologic temperatures. *Photochem Photobiol.* 2009;85(6):1364-1374.
202. Krespi YP, Kizhner V, Kara CO. Laser-induced microbial reduction in acute bacterial rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2009;23(6):e29-32.
203. Dadras S, Mohajerani E, Eftekhari F, et al. Different photoresponses of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to 514, 532, and 633 nm low level lasers in vitro. *Curr Microbiol.* 2006;53(4):282-286.
204. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm Laser Irradiation Delivering Radiant Exposure of 1-50 J/cm² on Three Species of Bacteria in Vitro . *J Clin Laser Med Surg.* 2003;20(6):325-333.

205. Gomes Gonçalves e Silva DC, Matiuzzi da Costa M, Aquino de Sá M da C, et al. Low level laser therapy (AlGaInP) applied at 5J/cm² reduces the proliferation of *Staphylococcus aureus* MRSA in infected wounds and intact skin of rats. *An Bras Dermatol*. 2013;88(1):50-55.
206. Ranjbar R, Takhtfooladi MA. The effects of low level laser therapy on *Staphylococcus aureus* infected third-degree burns in diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2016;31(4):250-255.
207. Pereira PR, De Paula JB, Cielinski J, et al. Effects of low intensity laser in in vitro bacterial culture and in vivo infected wounds. *Rev Col Bras Cir*. 2014.
208. Kaya GŞ, Kaya M, Gürsan N, et al. The use of 808-nm light therapy to treat experimental chronic osteomyelitis induced in rats by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Photomed Laser Surg*. 2011.
209. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease. *Photochem Photobiol*. 2004;3(5):436-450.
210. Bradley DS. Wounds. In: *Laser Therapy in Veterinary Medicine: Photobiomodulation*. John Wiley and Sons, ed.; 2017:100-113.
211. Colombo F, Neto A de APV, de Sousa APC, et al. Effect of low-level laser therapy (λ660 nm) on angiogenesis in wound healing: A immunohistochemical study in a rodent model. *Braz Dent J*. 2013;24(4):308-312.
212. Kurach LM, Stanley BJ, Gazzola KM, et al. The Effect of Low-Level Laser Therapy on the Healing of Open Wounds in Dogs. *Vet Surg*. 2015;44(8):988-996.
213. Jovell AJ, Navarro-rubio MD. Evaluación de la evidencia científica. *Med Clin (Barc)*. 1995;105(19):740-743.
214. Bendy R, Nuccio P, Wolfe B, et al. Relationship of quantitative wound bacterial counts to healing of decubiti. Effect of topical gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1964;(4):147-155.
215. Stallard Y. When and How to Perform Cultures on Chronic Wounds? *J Wound, Ostomy Cont Nurs*. 2018;45(2):179-186.
216. Bonham PA. Swab Cultures for Diagnosing Wound. 2009;36(August):389-395.
217. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, et al. Human skin wounds : A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen*. 2009;(17):763-771.
218. Zoutman D, McDonald S, Vethanayagan D. Total and attributable costs of surgical-wound infections at canadian tertiary-care center. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;19(4):254-259.
219. Harari 1993. Surgical Complications and Wound Healing in the Small Animal Practice. Vol 36.; 1995.
220. Swaim SF, Henderson AR. Bite Wound. In: *Small Animal Wound Management*. Lippincott J, 2nd ed. Philadelphia; 2002.

221. Kiliç N. Dog Bite Wounds : A Retrospective Study (114 Cases). 2003;14(2):86-88.
222. Philipsen TEJ, Molderez C, Gys T. Cat And Dog Bites. What To Do? *Acta Chir Belg.* 2006;106(6):692-695.
223. Dendle C, Looke D. Management of mammalian bites. *Aust Fam Physician.* 2009;38(11):868-873.
224. Abrahamian FM, Goldstein EJC. Microbiology of animal bite wound infections. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):231-246.
225. Krizek TJ, Robson MC. Evolution of quantitative bacteriology in wound management. *Am J Surg.* 1975;130(5):579-584.
226. Robson MC. Wound infection: A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):637-650.
227. Copeland-Halperin LR, Kaminsky AJ, Bluefeld N, et al. Sample procurement for cultures of infected wounds: a systematic review. *J Wound Care.* 2016;25(Sup4):S4-S10.
228. Meyers B, Schoeman JP, Goddard A, et al. The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non-infected dog bite wounds: Fifty cases. *Vet Microbiol.* 2008;127(3-4):360-368.
229. Cutting KF, White RJ, Mahoney P. Wound infection , dressings and pain , is there a relationship in the chronic wound ? *Int Wound J.* 2012:1-10.
230. Siah CJ, Childs C. A systematic review of the ASEPSIS scoring system used in non-cardiac-related surgery. *J Wound Care.* 2014;21(3):124-130.
231. Goldstein EJC. Bite Wounds and Infection. *Clin Infect Dis.* 1992;14:633-640.
232. Zook EG, Miller M, Van Beek AL, et al. Successful treatment protocol for canine fang injuries. *J Trauma.* 1980;20(3):243-247.
233. Cowell AK, Penwick RC. Dog bite wounds, a study of 93 cases. *Compend Contin Educ Pr Vet.* 1989;11:313-320.
234. Kelly PJ, Mason JE, Matthewman LA. Pathogens in dog bite wounds in dogs in Harare, Zimbabwe. *Vet Rec.* 1992;131:464-466.
235. Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, et al. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *N Engl J Med.* 1999;340(2):85-92.
236. Ball V, Younggren BN. Emergency Management of Difficult Wounds: Part I. *Emerg Med Clin North Am.* 2007;25(1):101-121.
237. Stegemann M, Sherington J, Blanchflower S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefovecin in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2006;(29):501-511.
238. Six R, Cherni J, Chesebrough R, et al. Efficacy and safety of cefovecin in treating bacterial folliculitis, abscesses, or infected wounds in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2008;233(3):433-439.

239. Stegemann MR, Coati N, Passmore CA, et al. Clinical efficacy and safety of cefovecin in the treatment of canine pyoderma and wound infections. *J Small Anim Pract.* 2007;48(7):378-386.
240. Balsa IM, Culp WTN. Wound Care. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2015;45(5):1049-1065.
241. Devriendt N, de Rooster H. Initial Management of Traumatic Wounds. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2017;47(6):1123-1134.
242. Liptak JM. An overview of the topical management of wounds. *Aust Vet J.* 1997;75(6):408-413.
243. Buffa EA, Lubbe AM, Verstraete FJM, et al. The Effects of Wound Lavage Solutions on Canine Fibroblasts : *Vet Surg.* 1997;26:460-466.
244. Barnes S, Spencer M, Graham D, et al. Surgical wound irrigation: A call for evidence-based standardization of practice. *Am J Infect Control.* 2014;42(5):525-529.
245. Gall TT, Monnet E. Evaluation of fluid pressures of common wound-flushing techniques. *Am J Vet Res.* 2010;71(11):1384-1386.
246. Lucas C, Stanborough CL, Freeman RJ, et al. F. Efficacy of low-level laser therapy on wound healing in human subjects: A systematic review. *Lasers Med Sci.* 2000;15(2):84-93.
247. Gomes R, Madureira K de nazaré. Laser therapy in wound healing associated with diabetes mellitus - Review 489. *An Bras Dermatol.* 2016;91(4):489-493.
248. Gonçalves WLS, Souza FM, Conti CL, et al. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Brazilian J Med Biol Res.* 2007;40(6):877-884.
249. Gammel JE, Biskup JJ, Drum MG, et al. Effects of low-level laser therapy on the healing of surgically closed incisions and surgically created open wounds in dogs. *Vet Surg.* 2018;47(4):499-506.
250. Novaes RD, Gonçalves R V., Cupertino MCM, et al. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. *Int J Exp Pathol.* 2013;95(2):138-146.
251. Gál P, Stausholm MB, Kováč I, et al. Should open excisions and sutured incisions be treated differently? A review and meta-analysis of animal wound models following low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2018;33(6):1351-1362.
252. de Sousa NTA, Gomes RC, Santos MF, et al. Red and infrared laser therapy inhibits in vitro growth of major bacterial species that commonly colonize skin ulcers. *Lasers Med Sci.* 2016;31(3):549-556.
253. de Sousa NTA, Santos MF, Gomes RC, et al. Blue Laser Inhibits Bacterial Growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(5):278-282.

254. Boyd JM, Lewis KA, Mohammed N, et al. *Propionibacterium acnes* susceptibility to low-level 449 nm blue light photobiomodulation. *Lasers Surg Med.* 2019;(March):lsm.23087.
255. Wang C, Yang Z, Peng Y, et al. Application of 460 nm visible light for the elimination of *Candida albicans* in vitro and in vivo. *Mol Med Rep.* 2018;18(2):2017-2026.
256. Nussbaum EL, Mazzulli T, Pritzker KPH, et al. Effects of low intensity laser irradiation during healing of skin lesions in the rat. *Lasers Surg Med.* 2009;41(5):372-381.
257. Karu T, Tiphlova O, Samokhina M, et al. Effects of Near-Infrared Laser and Superluminescent Diode Irradiation on *Escherichia Coli* Division Rate. *IEEE J Quantum Electron.* 1990;26(12):2162-2165.
258. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* in vitro: Effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med.* 1995;16(3):272-276.
259. Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, et al. Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med.* 2010;42(6):450-466.
260. Enwemeka CS, Williams D, Enwemeka SK, et al. Blue 470-nm Light Kills Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Vitro . *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):221-226.
261. Kim K-S, Lee PY, Lee J-H, et al. Effects of low level laser irradiation (LLLI) with 904 nm pulsed diode laser on *Staphylococcus aureus*. *Laser Ther.* 1997;(9):121-130.
262. Pereira PR, De Paula JB, Cielinski J, et al. Effects of low intensity laser in in vitro bacterial culture and in vivo infected wounds. *Rev Col Bras Cir.* 2014;41(1):49-55.
263. Gjødsbøl K, Skindersoe ME, Christensen JJ, et al. No need for biopsies: Comparison of three sample techniques for wound microbiota determination. *Int Wound J.* 2012;9(3):295-302.
264. Smith ME, Robinowitz N, Chaulk P, et al. Comparison of chronic wound culture techniques: swab versus curetted tissue for microbial recovery. *Br J Community Nurs.* 2014;19(Sup9):S22-S26.
265. Haalboom M, Blokhuis-Arkes MHE, Beuk RJ, et al. Wound swab and wound biopsy yield similar culture results. *Wound Repair Regen.* 2018;26(2):192-199.
266. Mouro S, Vilela CL, Niza MMRE. Clinical and bacteriological assessment of dog-to-dog bite wounds. *Vet Microbiol.* 2010;144(1-2):127-132.
267. Dao H, Kazin RA. Gender differences in skin: A review of the literature. *Gend Med.* 2007;4(4):308-328.
268. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-229.

269. Eugster S, Schawalder P, Gaschen F, et al. A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats. *Vet Surg.* 2004;33(5):542-550.
270. Galkowska H, Olszewski WL, Wojewodzka U, et al. Neurogenic Factors in the Impaired Healing of Diabetic Foot Ulcers. *Journal of Surgical Research.* 2006;134:252-258.
271. Brem H, Tomic-canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1219-1222.
272. Hofman D, Moore K, Cooper R, et al. Use of topical corticosteroids on chronic leg ulcers. *Journal of Wound Care.* 2007;16(5):227-230.
273. Franz MG, Steed DL, Robson MC. Optimizing Healing of the Acute Wound by Minimizing Complications. *Curr Probl Surg.* 2007;44(11):691-763.
274. Kirkland KB, Briggs JP, Trivette SL, et al. The impact of surgical-site infections in the 1990s: Attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999;20(11):725-730.
275. Scalise A, Calamita R, Tartaglione C, et al. Improving wound healing and preventing surgical site complications of closed surgical incisions : a possible role of Incisional Negative Pressure Wound Therapy . A systematic review of the literature. 2015:1-22.
276. Callaham M. Prophylactic antibiotics in common dog bite wounds: A controlled study. *Ann Emerg Med.* 1980;9(8):410-414.
277. Brook I. Microbiology of human and animal bite wounds in children. *Pediatr Infect Dis J.* 1987;6(1):29-32.
278. Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, et al. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *N Engl J Med.* 2016;340(2):85-92.
279. Burillo A, Moreno A, Salas C. Diagnóstico Microbiológico de Las Infecciones de Piel y Tejidos Blandos. 2006.
280. Zambori C, Cumpanasoiu C, Bianca M, et al. Biofilms in oral cavity of dogs and implication in zoonotic infections. 2013;46(1):155-158.
281. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 810 nm laser irradiation on in vitro growth of bacteria: Comparison of continuous wave and frequency modulated light. *Lasers Surg Med.* 2002;31(5):343-351.
282. Noelle D, Christiansen C, Dore D. Bactericidal Effect of 0.95-mW Helium-Neon and 5-mW Indium-Gallium-Aluminum-Phosphate Laser Irradiation at Exposure Times of 30, 60 and 120 Seconds of Photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro. *Phys Ther.* 2018;79(9):839-846.
283. Reddy GK. Comparison of the Photostimulatory Effects of Visible He-Ne and Infrared Ga-As Lasers on Healing Impaired Diabetic Rat Wounds. *Lasers Surg Med.* 2003;351(August):344-351.

284. Lee SY, Seong IW, Kim JS, et al. Enhancement of cutaneous immune response to bacterial infection after low-level light therapy with 1072 nm infrared light: A preliminary study. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2011;105(3):175-182.
285. Santos NRS, de M. Sobrinho JB, Almeida PF, et al. Influence of the Combination of Infrared and Red Laser Light on the Healing of Cutaneous Wounds Infected by *Staphylococcus aureus*. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(3):177-182.
286. Araujo BF, Silva LI, Meireles A, et al. Effects of Low-Level Laser Therapy, 660 nm, in Experimental Septic Arthritis. *ISRN Rheumatol.* 2013;2013:1-8.
287. Ezzati A, Bayat M, Taheri S, et al. Low-level laser therapy with pulsed infrared laser accelerates third-degree burn healing process in rats. *J Rehabil Res Dev.* 2009;46(4):543.
288. Wainwright M. Photodyami antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:13-28.
289. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) of 810 nm upon in Vitro Growth of Bacteria : Relevance of Irradiance and Radiant Exposure. 2003;21(5):283-290.
290. Bond R, Loeffler A, Clinical V, et al. What ' s happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. 2012;53(3).
291. Zakour NLB, Beatson SA, van den Broek AHM, et al. Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2(4):1-15.
292. Kisuk K, Hum LD, Kun KS. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on the proliferation of *Streptococcus mutans*. *Laser Therapy.* 1992:81-85.
293. Huang Y, Xie T, Cao Y, et al. Comparison of two classification systems in predicting the outcome of diabetic foot ulcers: The Wagner grade and the Saint Elian Wound score systems. *Wound Repair Regen.* 2015;23(3):379-385.