

EFFECTIVIDAD DE LA TERAPIA COMBINADA, MIEL DE ABEJA Y ULTRASONIDO, EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS SUPERFICIALES DE RATAS JÓVENES.

EFFECTIVENESS OF COMBINED THERAPY, BEE HONEY AND ULTRASOUND, IN SUPERFICIAL WOUND HEALING IN YOUNG RATS.

A. CIFUENTES AMIGO^A, S. INZULZA OPAZO^A, E. MÉNDEZ MUÑOZ^A, A. PACHECO VALLES^B, R. TADEU NASHBAR^C, W. DONOSOTORRES^D.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la efectividad de la terapia combinada, miel de abeja y US, en la cicatrización de heridas superficiales de ratas jóvenes.

Material y Método: Estudio experimental longitudinal prospectivo. Se utilizaron 20 ratas machos Sprague-Dawley divididas en cuatro grupos: Control (C), Miel (M), Ultrasonido (US) y Ultrasonido + Miel (US+M). Se realizó una herida de 1 cm² que se fotografió diariamente durante todo periodo, la cual recibió tratamientos por 13 días. Se midió y comparó el área de la herida de los distintos grupos los días 1, 3, 10 y 14. El día 14 se extrajo una muestra de tejido lesionado para su análisis histológico. Se utilizó la Escala de Vancouver modificada para la valoración cualitativa.

Resultados: En el día 14 hubo diferencias significativas entre los Grupos C vs M, US y US+M; M vs US y US+M ($p < 0,001$). Los grupos US y US+M presentaron mayores cantidades de colágeno que el Grupo C ($p < 0,05$). El Grupo C presentó mayor cantidad de células inflamatorias que los Grupos M y US ($p < 0,05$) y Grupo US+M ($p < 0,01$). Grupo US+M presentó mayor cantidad de vasos sanguíneos respecto al Grupo C ($p < 0,05$).

Conclusión: No hubo diferencia significativa entre los Grupos US y US+M al decimocuarto día, sin embargo, este último presentó la menor área de cicatrización en heridas superficiales de ratas jóvenes. Sería valioso proyectar a futuro mediciones de parámetros más específicos como Western Blotting, PCR y Test de Elisa, con el fin de comprender las implicancias moleculares que cada una de estas terapias presenta sobre el proceso de reparación tisular.

Palabras claves: Cicatrización, Ultrasonido, Miel de abeja

ABSTRACT

Objective: To determine the effectiveness of combined therapy, bee honey and ultrasound in superficial wound healing of young rats.

Material and method: Prospective longitudinal experimental study. 20 Sprague-Dawley male rats were used divided into four groups: Control (C), Honey (H), Ultrasound (US) and Ultrasound plus Honey (US+H). A 1 cm² wound was made, which was photographed daily throughout the period, and received treatment for 13 days. It was measured and compared the wound area from all groups at day 1, 3, 10 and 14. At day 14 a sample of injured tissue was extracted for histologic analysis. For qualitative valuation, Modified Vancouver Scale was used.

Results: At day 14, significant differences between H vs M, US and US+H; H vs US and US vs US+H were found ($p < 0,001$). US and US+H groups showed higher amount of collagen that group C ($p < 0,05$). Group C showed higher amount of inflammatory cells that groups H and US ($p < 0,05$) and group US+H ($p < 0,01$). Group US+H showed higher amount of blood vessels that group C ($p < 0,05$).

Conclusions: There were no significant differences between groups US and US+H at day 14, however, group US+H showed smaller healing area in superficial wound of young rats. It would be relevant for future measurements to consider more specific parameters such as Western Blotting, PCR and Elisa test, in order to understand the molecular implications posed by each therapy in the process of tissue repair.

INTRODUCCIÓN

La cicatrización de las heridas constituye una respuesta básica natural de los seres vivos y, en general, produce el restablecimiento satisfactorio de la integridad de los tejidos dañados. El conocimiento del proceso biológico de la reparación de heridas es esencial, pues la eficacia del tratamiento dependerá de la fase o etapa en que se intervenga la herida. El gran problema ha sido cómo tratarlas correctamente para acelerar los procesos de cicatrización, ya que mientras su intervención sea más temprana, las complicaciones y molestias disminuirán para el paciente, así como también los efectos de la terapia se verán optimizados¹.

Las herramientas que posee el kinesiólogo para contribuir a este proceso son escasas, una de ellas es el tratamiento con Ultrasonido (US), que desde el punto de la evidencia resulta ser controversial^{2,3}. En la última década, diversas investigaciones^{1,4-8} concluyeron que algunos métodos físicos de aplicación clínica, como el US y tratamientos de láser, mejora los tiempos y la calidad de la cicatrización¹. Por otro lado, existen métodos de tratamiento de medicina alternativa, que se han utilizado desde hace muchos años en el tratamiento de las heridas infectadas. Estudios han señalado que la aplicación de miel de abeja produce disminución del edema, control de la infección y estimula la cicatrización⁹⁻¹³. Por todo lo anterior, se vuelve una alternativa factible a considerar en el manejo y tratamiento de las heridas. El propósito de éste estudio es determinar la efectividad del uso combinado de agentes físicos, US y miel de abeja, en el tratamiento de la cicatrización de heridas en ratas jóvenes.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio experimental longitudinal prospectivo, aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Católica del Maule y realizado en el Bioterio de ésta misma en el mes de Marzo del año 2013. Se utilizaron 20 ratas Sprague-Dawley, machos de 2 meses de edad de $212,7 \pm 2,8$ g. Se sometieron a condiciones estandarizadas de clima controlado: ciclo de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, temperatura de 21 ± 2 °C, agua y comida ad libitum. Las ratas se dividieron de aleatoriamente en cuatro grupos: Control (C, n=5); Miel (M, n=5); Ultrasonido (US, n=5) y Terapia combinada (US+M, n=5). Los animales fueron anestesiados utilizando Ketamina (75 mg/kg) y Xilazina (10 mg/kg), se rasuró la región dorsal en donde se realizó una incisión superficial de 1 cm², tomando como referencia el estudio de Rodrigues et al. (2012)¹⁴.

Todos los tratamientos realizados comenzaron dentro de los 30 primeros minutos posteriores a la intervención quirúrgica. Previo a cada una de las sesiones de tratamiento, las ratas fueron sedadas mediante la utilización de éter etílico, empleando una cámara de anestesia.

- Grupo Control: Los animales no fueron sometidos a terapias de tratamiento, dejando que la incisión cicatrizará mediante los procesos fisiológicos normales.

- Grupo Miel: Se aplicó 1,5 mL de miel artesanal sobre la herida mediante una jeringa de 3 cc. procedente de Cooperativa Apícola "El Quillay" (San Clemente, Región del Maule, Chile).

- Grupo US: Se utilizó un equipo de US modelo Sonopuls 490u (ENRAF Nonius Co., España). El equipo fue utilizado en modo pulsado, 20% duty cycle, una frecuencia de 3 MHz e intensidad de 0,5 W/cm²¹⁵⁻¹⁷. Su aplicación tuvo un tiempo de 5 minutos diarios durante cada uno de los 13 días de terapia³.

- Grupo US+M: Se realizó el mismo procedimiento descrito para el Grupo US. Finalizado el tratamiento anterior, se realizó el procedimiento del Grupo M.

Las heridas fueron fotografiadas diariamente (previo a la aplicación de las respectivas terapias) con una cámara Fujitel Finepix JX500 (14 Mpx, 5x Zoom óptico) dispuesta sobre un trípode a 25 cm. de altura y de forma perpendicular a la superficie de trabajo. Se utilizó el software ImageJ (versión 1,46j; National Institute of Health, USA, 2006) para cuantificar el área de las heridas los días 3, 7, 10 y 14. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto del área de la herida original. La fórmula empleada para su cálculo fue la siguiente:

$$\% \text{ Cierre de Herida} = \left(\frac{\text{Área inicial (cm}^2\text{)} - \text{Área día } x \text{ (cm}^2\text{)}}{\text{Área inicial (cm}^2\text{)}} \right) \times 100$$

El día 14 se extrajo la muestra de tejido en donde se realizó la herida. Para la tinción de las muestras, se realizó el procedimiento estándar de Hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson. Finalmente, la evaluación histométrica se realizó mediante un microscopio (Zeiss Trinocular Primo Star®), se fotografiaron con en el objetivo 10x con la cámara fotográfica (Canon® Modelo Eos Rebel xsi) por medio del software EOS Utility (versión 2.4, Copyright© CANON INC, USA, 2008). Luego, a través del programa AxionVision (versión 4.8.1.0, Carl Zeiss Imaging Solutions, Thornwood, NY, USA, 2006-2009) un experto familiarizado con la técnica determinó un sector representativo en la imagen correspondiente a un

	C	M	US	US+M
Cantidad de Colágeno (UA) ^φ	163,9 ± 3,542	175,8 ± 4,841	181,6 ± 3,312*	182,0 ± 2,621*
Cantidad de Células Inflamatorias (n°) ^φ	754,8 ± 30,12	525 ± 26,99*	525,5 ± 76,68*	491,6 ± 51,64**
Cantidad de Vasos sanguíneos (n°) [†]	1 ± 0,5477	4,8 ± 1,934	7,750 ± 2,175	12,4 ± 4,179*

Tabla 1

Comparación de los grupos de tratamiento vs el Grupo Control en la cantidad de colágeno, células inflamatorias y vasos sanguíneos. Los datos son expresados en promedio ± error estándar. ^φ Prueba estadística: ANOVA simple de un factor con post hoc Test de Tukey. [†] Prueba estadística: Kruskal-Wallis post hoc Test de Dunns. * p<0,05; ** p<0,01.

área de 250.000 μm^2 , la cual fue finalmente analizada. Este procedimiento se utiliza de forma uniforme para la medición de todos los parámetros histométricos.

Cada procedimiento (intervención quirúrgica, incisión de la herida, sedación, tratamiento y toma de fotografías) fue realizado por un mismo evaluador respectivamente.

- Medición de colágeno: Utilizando el vector de "Tricómico de Masson" del plugin Colour Deconvolution del software ImageJ, se eligió e invirtió la foto Colour_1 y se seleccionó el área representativa ya definida en pasos anteriores. Una vez obtenido el dato de la intensidad de densitometría se dividirá por el área representativa seleccionada. Los datos se expresaron en unidades arbitrarias. El alineamiento del colágeno fue evaluado cualitativamente por el mismo experto.

- Células inflamatorias y Vasos sanguíneos: Se utilizó el software ImageJ con la herramienta multipunto para seleccionar y marcar cada una de las células inflamatorias y vasos sanguíneos. Las células inflamatorias fueron identificadas por sus núcleos basófilos y redondeados.

La valoración cualitativa de la herida se realizó los días 3, 7, 10 y 14 mediante la utilización de la Escala de cicatrización de Vancouver modificada, la cual evalúa pigmentación, flexibilidad, vascularidad y altura de la herida¹⁸. Esta fue aplicada en todas las ocasiones por el mismo evaluador.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prisma® (versión 5,01; Inc., El Camino Real, CA USA, 2007). La distribución de normalidad de los datos fue analizada empleando la prueba de Shapiro Wilk. Todos los datos son expresados en media ± error estándar. La diferencias entre grupos fue realizada mediante la prueba estadística ANOVA simple de un factor y la prueba de Tukey post hoc. Para el análisis de las variables discretas y de aquellos datos que no presentaron una distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con un post hoc test de Dunns para establecer diferencias entre los grupos. Se consideró estadísticamente significativo p<0,05. La medición

de las muestras histológicas fue realizado de forma ciega por tres observadores. La concordancia entre éstos fue analizada mediante el Índice de Kappa, arrojando un valor de 0,9.

Al tercer día transcurrido el proceso experimental, falleció una rata correspondiente al Grupo US, por ende, todos los datos obtenidos hasta ese entonces del animal, fueron excluidos de todo cálculo estadístico.

• Área de la cicatriz

Las fotografías representativas y el porcentaje del área de las heridas durante el transcurso de los 14 días de experimentación se observan en la figura 1 y 2 respectivamente.

No se encontró diferencia significativa entre los grupos durante el día 3 (p=0,3577). En el día 7 y 10 solo existen diferencias significativas entre el Grupo C vs Grupo US (p<0,05). Finalmente, para el día 14, hubo diferencias significativas entre los Grupos C vs M, US y US+M; M vs US y US+M (p<0,001) siendo el más efectivo el Grupo US+M. No hubo diferencia significativa entre los Grupos US y US+M (**Figura 3**).

• Calidad de la cicatriz

La aplicación de la Escala de cicatrización de Vancouver modificada demostró que no hubo diferencias significativas entre grupos durante los días de experimentación.

• Histometría

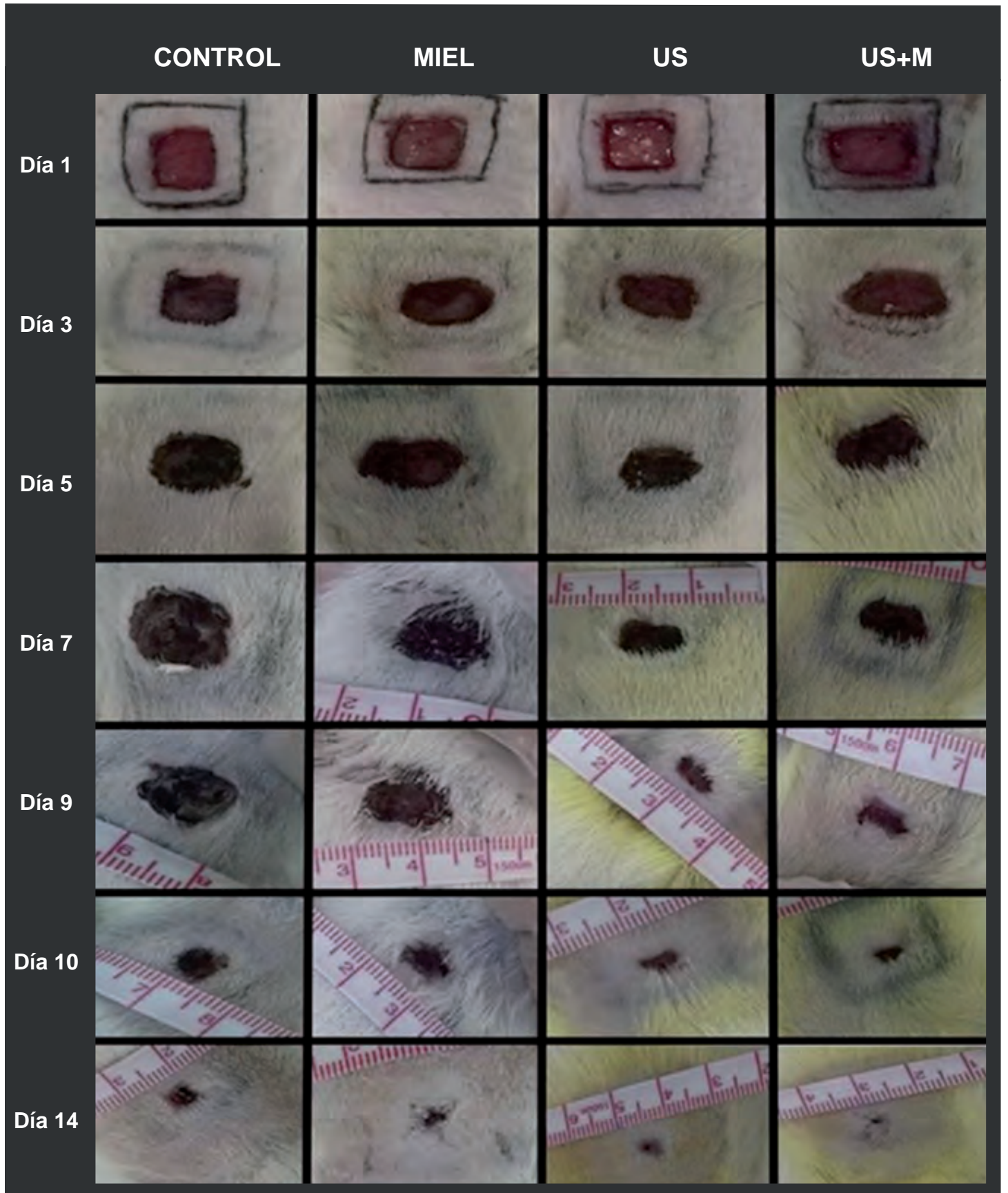
-Colágeno: Las cantidades de colágeno fueron significativamente mayores en los Grupos US y US+M en comparación al Grupo C (p<0,05). Los Grupos US+M y US presentaron mayor alineación de las fibras de colágeno.

-Células inflamatorias: El Grupo C presentó una cantidad de células inflamatorias significativamente mayor en comparación a las encontradas en los Grupos M (p<0,05), US (p<0,05) y US+M (p<0,01).

-Vasos sanguíneos: Sólo el Grupo US+M obtuvo una cantidad de vasos sanguíneos significativamente mayor que la exhibida por el Grupo C (p<0,05) (**Tabla 1**) (**Figura 4**).

Figura 1

Fotografías representativas del área de heridas de los distintos grupos durante el transcurso de los 14 días experimentales.



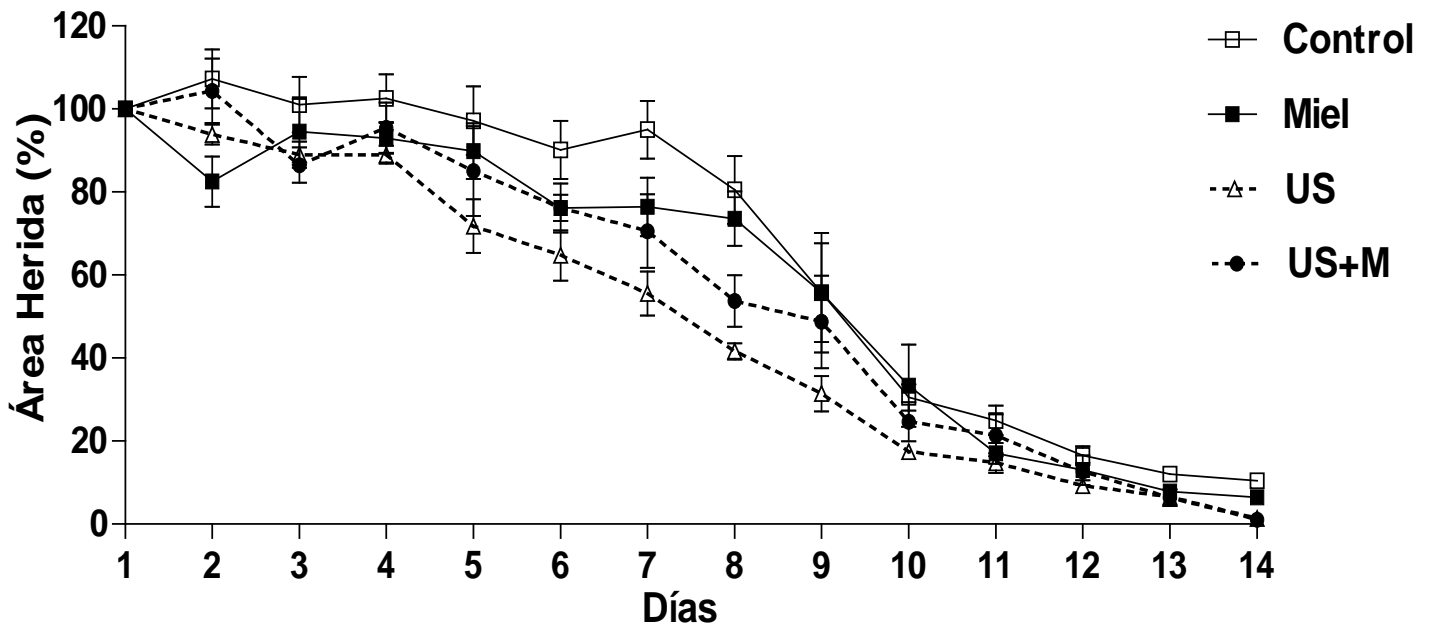


Figura 2

Valores del área de la herida durante el transcurso de los 14 días experimentales. Los datos son expresados en porcentaje promedio \pm error estandar.

DISCUSIÓN

• Área de la cicatriz.

De acuerdo a la literatura revisada, esta es la primera investigación que analiza la cicatrización utilizando como tratamientos el US y miel de abeja de forma conjunta, lo que dificulta su contraste con otros resultados en todos los ámbitos evaluados.

No se encontraron estudios donde compararan el efecto de la cicatrización al tercer día de experimentación. No obstante, la menor área de herida presentada por el Grupo US+M podrían explicarse por el efecto que genera el US pulsado en la fase inflamatoria (48-72 horas) posterior a una injuria^{1,3,8} sumado a la propiedad antiinflamatoria que el peróxido de hidrógeno le otorga a la miel¹³.

Los datos del séptimo día presentan concordancia con lo reportado por Altomare et al. (2009)³, quienes aplicaron US pulsado a una intensidad 0,5 watt/cm² en heridas superficiales e hipoxémicas en ratas machos Wistar. No existen estudios que realicen dicha comparación al décimo día. De acuerdo a la teoría, la etapa de proliferación comienza aproximadamente entre el 2º y 10º día posterior a la lesión^{19,20}, lo cual, llevaría a pensar que el US ayudaría a reducir los tiempos de la fase proliferativa, tal como lo plantean diversos estudios^{1,4,6,21-23}. Por su parte, los resultados del Grupo M no presentaron similitud con los expuestos por Bergman et al.

(1983)²⁴, sin embargo, cabe señalar que en su estudio compararon sus datos los días 6 y 9 de experimentación. Nuestros datos del Grupo M al decimocuarto día, se asemejan a los resultados expuestos por diferentes estudios²⁴⁻²⁸. Dicho efecto podría explicarse por el aumento en la liberación de MMP-9, TGF- β y el efecto higroscópico en la fase de remodelación²⁹. Por su parte los resultados del Grupo US no coinciden por lo planteado por Altomare et al. (2009)³, la respuesta a esta disimilitud puede encontrar sustento en que dicho autor sólo aplica US pulsado durante los días 1, 2 y 4 posteriores a la cirugía. Sin embargo, se confirmó la relevancia que presenta el US pulsado en la fase de remodelación en heridas de tejidos blandos^{1,4,6,21,22,23,30}.

El Grupo US+M en el día 14 de experimentación fue el más efectivo en la reducción del área de la cicatriz, expresando un efecto sinérgico tardío entre ambas terapias, contrario a lo ocurrido en los días 3, 7 y 10. Esta diferencia en los resultados se puede explicar en el efecto retardado que manifiesta la miel en el proceso de cicatrización, la cual sólo manifiesta diferencias significativas en el cierre de herida el día 14. Finalmente, se puede señalar que si bien no hubo diferencia significativa entre los grupos US y US+M, este último presenta una mayor tendencia hacia la disminución.

• Calidad de la cicatriz.

La mayor parte de las publicaciones revisadas realizan el

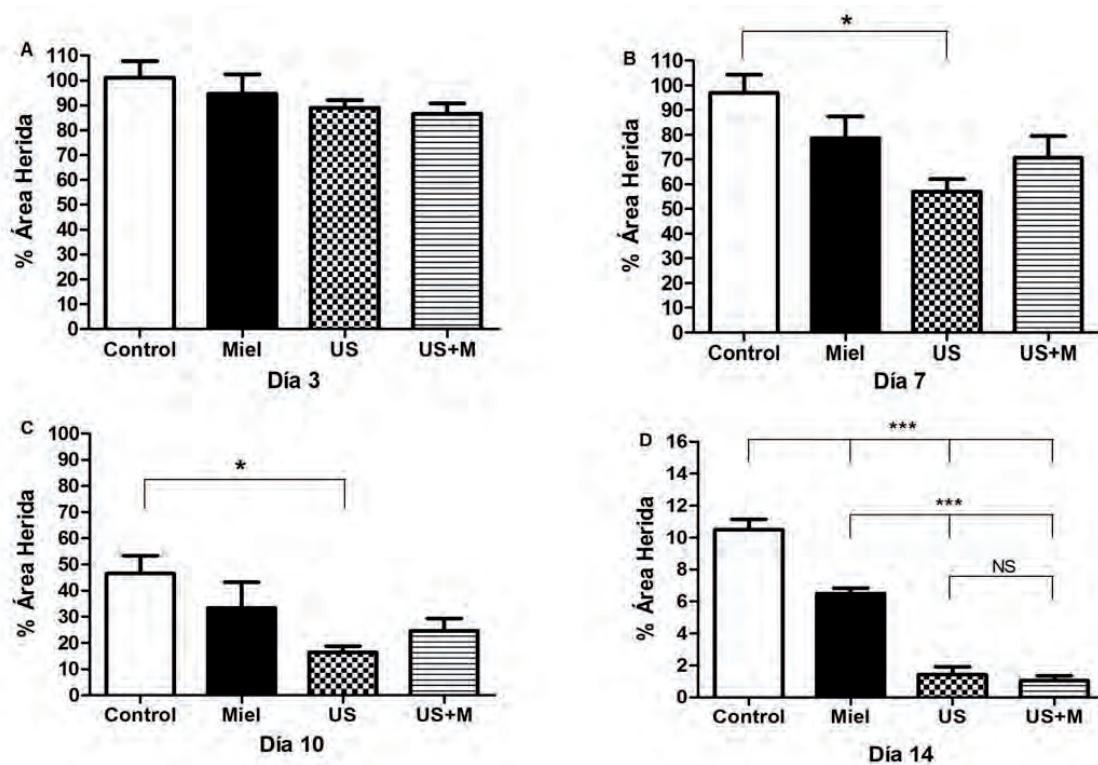
**Figura 3**

Figura 11. Diferencias del porcentaje de cierre de herida en los distintos grupos en el día 3 (A), 7 (B), 10 (C) y 14 (D) de experimentación. Prueba estadística: ANOVA simple de un factor post hoc test de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; NS: No significativo.

análisis de sus resultados a través de evaluaciones cuantitativas a nivel macroscópico^{16,24,25,27} y semicuantitativas o cualitativas a nivel microscópico^{1,3,15,28,31,32}, omitiendo el análisis cualitativo de esta.

- Histometría.

- Colágeno.

Los resultados respecto al Grupo US presentan concordancia con los datos expuestos por diversos autores^{1,21,32} quienes encontraron al día 10^o, 14^o y 14^o respectivamente una mejora en la disposición^{1,3,33}, síntesis^{1,21,32,34} y fortalecimiento^{3,33} de las fibras de colágeno en comparación con el Grupo C. Dichos hallazgos han sido ampliamente comprobados, brindando argumentos suficientes para inferir las características que determinan la efectividad de la terapia. Rozaini et al. (2004)³⁵ en su publicación realizada en heridas por quemaduras de ratas Sprague-Dawley y tratadas con diferentes variedades de miel, concluyen que existe un aumento significativo en la síntesis y disposición de las fibras de colágenos en todos los grupos tratados con miel, lo que no se asemeja a los resultados del presente estudio. Velnar et al. (2009)³⁶, afirman en su estudio que un aumento en la síntesis de colágeno tipo I y una adecuada orientación de sus fibras son necesarios para finalizar de forma óptima el proceso de cicatrización. Estas características, se cumplen en el presente estudio, tanto para la miel como el US, condu-

ciendo a la noción de una sinergia entre ambas terapias.

- Células inflamatorias

Nuestros resultados son consistentes con lo planteado por Demir et al. (2004)¹ y Altamore et al. (2009)³ quienes concluyeron que los grupos tratados con US presentaron escasos focos de células inflamatorias en comparación al Grupo C, lo que justifica por lo planteado por diversos autores quienes aluden a un efecto antiinflamatorio del US^{1,4,6,23,37}.

Con respecto al Grupo M, nuestros resultados son homologables a lo expuesto por Sukur et al. (2011)²⁷ y dos Santos et al. (2012)²⁸ y, donde aquellas ratas que recibieron tratamiento con miel presentaron menor cantidad de células inflamatorias en comparación con el Grupo C.

De acuerdo a las publicaciones revisadas, éste es el primer estudio que combina estas dos técnicas de tratamiento, dificultando la comparación de los resultados obtenidos, sin embargo, en base a lo planteado por los autores señalados anteriormente, sería posible inferir que la menor expresión de células inflamatorias en el Grupo US+M, tendría sustento en una posible sinergia de los efectos antiinflamatorios demostrados por los tratamientos de miel^{27,28} y US^{1,3}.

- Vasos sanguíneos

Si bien nuestros resultados manifiestan una tendencia hacia el aumento de los vasos sanguíneos, no concuerdan con los datos obtenidos por Altomare et al. (2009)³, donde sí obtuvieron diferencias significativas entre el Grupo US y el Grupo C.

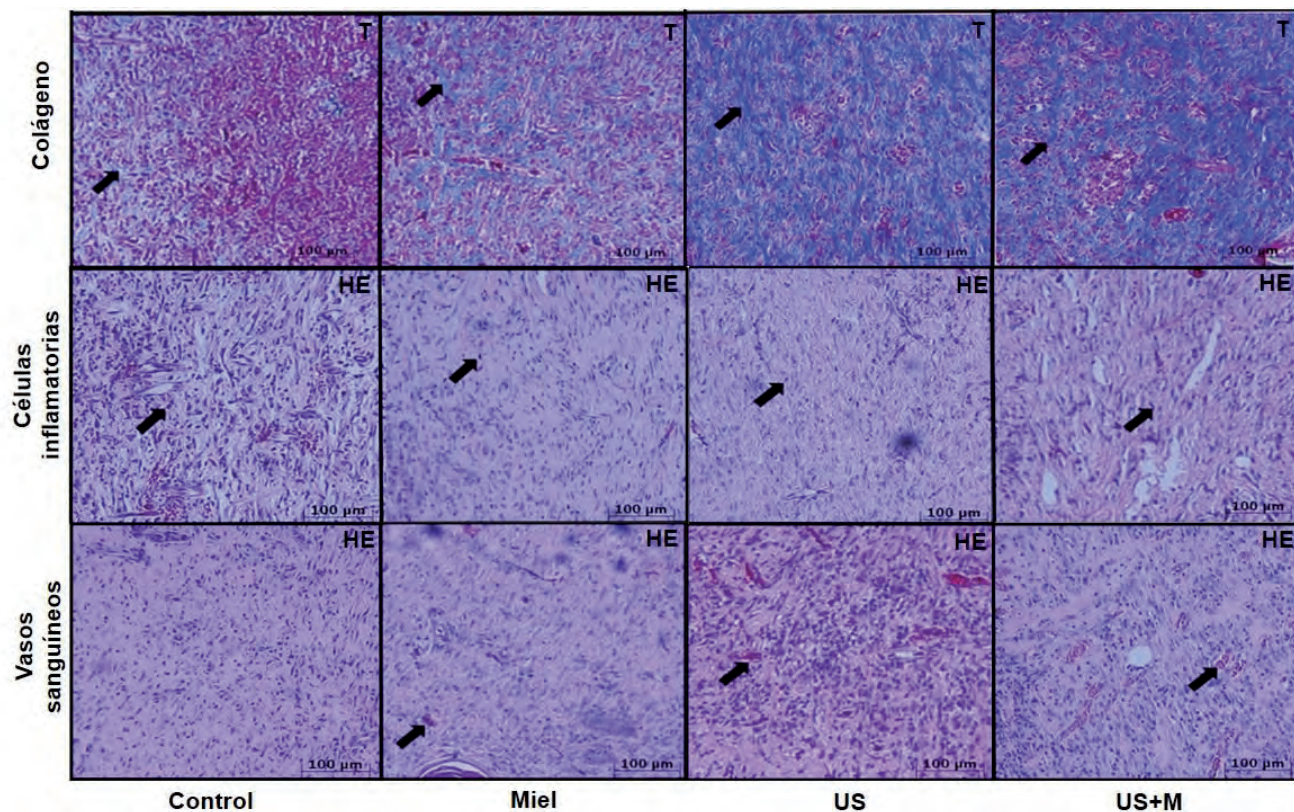


Figura 4

Imágenes representativas de fibras de colágeno, células inflamatorias y vasos sanguíneos presentes en las muestras histológicas de los diferentes grupos de experimentación. T: Tinción Tricrómico de Masson; HE: Hematoxilina-eosina. Aumento 10X. Flechas indican la presencia del elemento.

No obstante, esta disimilitud puede ser explicada por la diferencia en las metodologías utilizada para la medición de vasos sanguíneos. Por su parte, la miel tuvo una mayor cantidad de vasos sanguíneos respecto al Grupo C, de manera similar a lo planteado por el estudio de Dos Santos et al. (2012)²⁸.

El efecto sinérgico que presenta el Grupo US+M se puede deber a la estimulación de factores angiogénicos tales como IL-8²⁹, FGF³³ y VEGF³⁸ que produce la miel y el US. Esta estimulación en la neovascularización genera que el proceso de cicatrización se desarrolle en menor tiempo y con mejores resultados³³.

En consecuencia a lo manifestado en el presente estudio, sería de importancia continuar con esta línea investigativa, para que en un futuro próximo poder proyectar la utilidad de esta terapia al ámbito clínico kinésico. Finalmente, sería valioso incorporar mediciones de parámetros más específicos Western Blotting, PCR y Test de Elisa, con el fin de comprender las implicancias moleculares que cada una de estas terapias tiene sobre el proceso de reparación tisular.

CONCLUSIÓN

El proceso de cicatrización tiene una gran relevancia en contextos clínicos, en donde una menor duración de éste, implica una recuperación funcional anticipada. En el presen-

te estudio, todos los tratamientos obtuvieron un porcentaje de cierre de herida significativamente menor al presentado por el Grupo C al decimocuarto día, pudiendo comprobar y rectificar que una de las herramientas fisioterapéuticas que posee el kinesiólogo en adición a la aplicación de miel provoca cambios benéficos a nivel celular en la reparación de heridas superficiales de ratas jóvenes.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa ANDOVER, Chile, por confiar en nosotros y facilitarnos el Ultrasonido utilizado en ésta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Demir H., Yaray S., Kirnap M., Yaray K. (2004). Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev*, 41(5), 721–28.
2. Attinger C., Hess C., Howard M. (2003). A Review of Mechanical Adjuncts in Wound Healing: Hydrotherapy, Ultrasound, Negative Pressure Therapy, Hyperbaric Oxygen and Electrostimulation. *Ann Plast Surg*. 51(2), 210-18.
3. Altomare M., Nascimiento A., Romana-Souza B., Amadeu T., Monte-Alto-Costa A. (2009). Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. *Wound Repair Regen*. 17(6), 825–831.

4. Speed C. (2001). Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology*, 40(12), 1331-36.
5. Baker K., Robertson V. (2001). A Review of Therapeutic Ultrasound: Effectiveness Studies. *Phys Ther*, 81(7), 1339-1350.
6. Zhou S., Schmelz A., Seufferlein T., Li Y., Zhao J., Bachem M. (2004). Molecular Mechanisms of Low Intensity Pulsed Ultrasound in Human Skin Fibroblasts. *JBC*, 279(52), 54463-69.
7. Breuing K., Bayer L., Neuwalder J., Arch M., Orgill D. (2005). Early experience using low-frequency ultrasound in chronic wound. *Ann Plast Surg*, 55(2), 182-87.
8. Murat I. (2006). The effect of ultrasound on flap survival: An experimental study in rats. *Burns*, 33(3), 369-371.
9. Molan P. (1999). The role of honey in the management of wounds. *JWC*, 8(8), 415-18.
10. Molan P. (1999). Why honey is effective as a medicine. 1 Its use in modern medicine. *Bee World*, 80(2), 80-92.
11. Bang L., Bunting C., Molan P., Phil M. (2003). The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. *J Altern Complem Med*, 9(2), 267-273.
- 12.- Molan P. (2006). Using honey in wound care. *IJCA*, 3(2), 21-4.
- 13.- Sharp A. (2009). Beneficial effects of honey dressings in wound management. *Nurs Stand*, 24(7), 66-74.
14. Rodrigues H., Vinolo M., Magdalon J., Vitzel K., Nachbar R., Pessoa A., et al. (2012). Oral Administration of Oleic or Linoleic Acid Accelerates the Inflammatory Phase of Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*. *J Invest Dermatol*, 132, 208-215.
15. Young S., Dyson M. (1990). Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonic*, 28(3), 175-180.
16. Byl N., McKenzie A., Wong T., West J., Hunt T. (1993). Incisional Wound Healing: A Controlled Study of Low and High Dose ultrasound. *JOSPT*, 18(5), 619-628.
17. Lowe A., Walker M., Cowan R., Baxter G. (2001). Therapeutic Ultrasound and Wound Closure: Lack of Healing Effect on X-Ray Irradiated Wounds in Murine Skin. *Arch Phys Med Rehabil*, 82(11), 1507-1511.
18. Sullivan T., Smith J., Kermod J., McIver E., Courtemanche J. (1990). Rating the Burn Scar. *J Burn Care Rehabil*, 11(3), 256-260.
19. Gurtner G., Werner S., Barrandon Y., Longaker M. (2008). Review Article. Wound repair and regeneration. *Nature*, 453, 314-321.
20. Reinke J., Sorg H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res*, 49(1), 35-43.
21. Freitas T., Gomes M, Fraga D., Freitas L., Rezin G., Santos P, et al. (2010). Effects of therapeutic ultrasound on lipoperoxidation and fibrogenesis in an animal model of wound healing. *JSR*, 161(1), 168-171.
22. Paliwal S., Mitragotri S. (2008). Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. *Ultrasonics*, 48(4), 271-78.
23. Watson T. (2008). Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics*, 48(4), 321-29.
24. Bergman A., Yanal J., Weiss J., Bell D., David M. (1983). Acceleration of Wound Healing by Topical Application of Honey. An Animal Model. *AJS*, 145(3), 374-76.
25. Gutiérrez C., Castañón C., Güitrón A., Vega J. (2005). Modelo para la valoración cuantitativa de la cicatrización. Estudio piloto con miel de abeja. *Cir Gen*, A. C., 27(2), 114-19.
26. Iftikhar F, Arshad M., Rasheed F, Amraiz D., Anwar P, Gulfranz M. (2010). Effects of Acacia Honey on Wound Healing in Various Rat Models. *Phytother. Res*, 24(4), 583-86.
27. Sukur S., Halim A., Banga K. (2011). Evaluations of bacterial contaminated full thickness burn wound healing in Sprague Dawley rats Treated with Tualang honey. *IJPS*, 44(1), 112-17.
28. dos Santos I., Grosso S., Bambo O., Nhambirre A., Cardoso J., Schmidt E., et al. (2012). Mel e açúcar mascavo na cicatrização de feridas. *Ciênc Rural*, Santa Maria, 42(12), 2219-2224.
29. Lee D., Sinno S., Khachemoune A. (2011). Honey and wound healing. An overview. *Am J Clin Dermatol*, 12(3), 181-190.
30. Pérez L., Fuenzalida C., Marín M., Soto M., Hormazábal F, Bravo A., et al. (2012). Efectividad Cicatrizante del Ultrasonido y Cuidados de Enfermería en úlceras varicosas del CESFAM Dr. José Dionisio Astaburuaga de Talca: Un estudio piloto. *Revista Chilena de Medicina Familiar*, 11(1), 19-24.
31. Nisbet H., Nisbet C., Yarim M., Guler A., Ozak A. (2010). Effects of Three Types of Honey on Cutaneous Wound Healing. *Wounds*, 22(11), 275-283.
32. Guimarães G., Pires-De-Campos M., Leonardi G., Dib-Giusti H., Polacow M. (2011). Effect of ultrasound and dexpanthenol on collagen organization in tegumentary lesions. *Rev Bras Fisioter*, 15(3), 227-232.
33. Doan N., Meghji S., Harris M. (1999). In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg*, 57(4), 409-419.
34. Lai J., Pittelkow M. (2007). Physiological effects of ultrasound mist on fibroblasts. *IJD*, 46(6), 587-593.
35. Rozaini M., Zuki A., Noordin M., Norimah M., Nazrul A. (2004). The Effects of Different Types of Honey on Tensile Strength Evaluation of Burn Wound Tissue Healing. *INT J APPL RES VET M*, 2(4), 290-96.
36. Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. (2009). The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *IJMRS*, 37(5), 1528-1542.
37. de Oliveira R., Pires D., Pacheco C. (2011). Effect of low-intensity pulsed ultrasound on I929 fibroblasts. *Arch Med Sci*, 7(2), 224-29.
38. Halloran C., Slavin J. (2002). Pathophysiology of Wound Healing. *Surgery*, 20(5), 1-5.

Título acotado: Ultrasonido y miel de abeja en la cicatrización.

^A Estudiantes Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Kinesiología, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile

^B Profesor Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Kinesiología, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile

^C Becario de la Universidad de Edmonton.

^D Profesora Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad de Talca, Talca, Chile

No existe conflicto de interés por ninguno de los autores.

Correspondencia:

Nombre: Armando Andrés Cifuentes Amigo
Teléfonos: +(56)712640515 // +(56)999125461
Mail: armandocifuentes@gmail.com