

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



Trabajo Final presentado para optar al Grado de Médico Veterinario
Modalidad: Trabajo de investigación

**VIABILIDAD DE COLGAJOS CUTÁNEOS EN CONEJOS CON EL
USO DE PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO**

Nombre del alumno: Florencia Anahí Rivero
DNI: 37.629.390

Directora: Patricia Alejandra Bertone
DNI: 17.412.879

Codirectora: Anabela Benzoni
DNI: 28.821.240

Río Cuarto, Córdoba
Diciembre, 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Viabilidad de colgajos cutáneos en conejos con el uso de Plasma Rico en Factores de Crecimiento

Autor: Florencia Anahí Rivero

D.N.I: 37.629.390

Director: Patricia Alejandra Bertone

Codirector: Anabela Benzoni

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Virginia Mac Loughlin _____

Claudio Boaglio _____

Fecha de presentación: ____/____/____

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mi familia y a mi novio por el apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera, sin ellos nunca hubiese podido alcanzar mi gran objetivo.

A los amigos y futuros colegas que ésta hermosa carrera me brindó, gracias por acompañarme y facilitar mi recorrido, ocuparán siempre un lugar en mi corazón.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por formarme no sólo como profesional sino también como persona.

A los profesores de las distintas asignaturas, quienes me brindaron las herramientas necesarias para llegar hasta aquí y poder seguir formándome en un futuro. Agradezco especialmente a Patricia Bertone y Anabela Benzoni por el apoyo, el tiempo y la dedicación durante la realización de mi trabajo para poder culminar con esta linda etapa final.

A los profesores Virginia Mac Loughlin y Claudio Boaglio por su labor en la corrección de mi trabajo final de grado.

ÍNDICE DE TEXTO

RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCION	9
MARCO TEORICO	12
1.1. La piel	12
1.1.1. Funciones y propiedades	12
1.1.2. Histología	12
1.1.3. Circulación	12
1.1.4. Afecciones	13
1.2. Herida	13
1.2.1. Concepto	13
1.3. Cicatrización	13
1.3.1. Definición	13
1.3.2. Fases de la cicatrización	13
1.3.2.1. Fase inflamatoria	14
1.3.2.2. Fase proliferativa	15
1.3.2.2.1. Fibroplasia	15
1.3.2.2.2. Neovascularización	16
1.3.2.2.3. Epitelización	16
1.3.2.3. Fase madurativa	17
1.3.3. Factores locales y generales que influyen en el proceso de cicatrización	17
1.3.3.1. Factores locales y generales que retrasan el proceso de cicatrización	17
1.3.3.2. Factores locales y generales que aceleran el proceso de cicatrización	17

1.4. Tipos de cicatrización de heridas	18
1.4.1. Cicatrización primaria o por primera intención	18
1.4.2. Cicatrización secundaria o por segunda intención	18
1.4.3. Cicatrización terciaria o por tercera intención	18
1.4.4. Cicatrización por cuarta intención	19
1.5. Colgajos cutáneos	19
1.5.1. Definición y clasificación	19
1.5.2. Complicaciones	19
1.6. Plaquetas	20
1.6.1. Definición	20
1.6.2. Función	21
1.6.3. Composición	21
1.7. Factores de crecimiento	22
1.7.1. Definición	22
1.7.2. Función	22
1.7.3. Tipos de factores de crecimiento	22
1.7.3.1. Factor de crecimiento de origen plaquetario	22
1.7.3.2. Factor de crecimiento de origen epidérmico	23
1.7.3.3. Factor de crecimiento endotelio vascular	23
1.8. Plasma Rico en Factores de Crecimiento	23
1.8.1. Concepto	23
1.8.2. Utilidad	23
1.8.3. Obtención	23
1.8.4. Capacidad regenerativa	24
OBJETIVOS	25

2.1. Objetivo general	25
2.2. Objetivos específicos	25
METODOLOGIA	26
RESULTADOS	29
DISCUSION	39
CONCLUSION	41
BIBLIOGRAFIA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Aspecto macroscópico de colgajo de conejo tratado con PRFC donde se observa la viabilidad del tejido.	29
2	Aspecto macroscópico de colgajo de conejo control, se evidencia mayor área de necrosis tisular.	30
3	Corte histológico de piel de conejo 1 control a los 7 días post quirúrgico.	31
4	Corte histológico de piel de conejo 1 control a los 7 días post quirúrgico. Se evidencias abundantes eritrocitos.	31
5	Corte histológico de piel de conejo 1 tratado con PRFC a los 7 días de evolución, se observa importante engrosamiento del epitelio y una gruesa capa de queratina.	32
6	Corte histológico de piel de conejo 1 tratado con plasma a los 7 días donde empiezan a distinguirse pequeños brotes de capilares.	32
7	Corte histológico de piel de conejo 1A tratado con PRFC a los 7 días de cicatrización.	33
8	Corte histológico de piel de conejo 1A tratado con PRFC a los 7 días de evolución. Se evidencia neovascularización.	33
9	Corte histológico de piel de conejo 1 control donde se observa epidermis y dermis papilar a los 15 días.	34
10	Corte histológico de piel de conejo 1 control a los 15 días de cicatrización, mayor calibre de vasos.	34
11	Corte histológico de piel de conejo 1 tratado con PRFC, a los 15 días de la intervención quirúrgica, se aprecian en la imagen numerosos islotes de vasos sanguíneos.	35
12	Corte histológico de piel de conejo 1A con PRFC, a los 15 días post quirúrgicos, se evidencian focos de células endoteliales y eritrocitos.	35
13	Corte histológico de piel de conejo 1A con PRFC, a los 15 días post quirúrgicos. Se observa neovascularización.	36
14	Corte histológico de piel de conejo control a los 30 días de cicatrización.	36
15	Corte histológico de piel de conejo 1 tratado con PRFC a los 30 días.	37

- 16 Corte histológico de piel de conejo 1A tratado con PRFC a los 30 días postratamiento. 37
- 17 Resultados de valores promedio de vasos sanguíneos en los colgajos cutáneos en conejos en grupos control y tratados con PRFC a los 5, 7 y 15 días posoperatorios. Representación gráfica y numérica. 38

RESUMEN

En cirugía reconstructiva la complicación más temida en la cicatrización de un colgajo cutáneo es un área significativa de necrosis, es decir la muerte celular por falta de nutrientes ocasionando el fracaso del procedimiento quirúrgico realizado. Una opción terapéutica para mejorar la sobrevida del tejido es el uso de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC), un volumen de plasma autólogo que posee el doble de concentración plasmática fisiológica plaquetaria (200.000 plaquetas/ μ l) obtenido a través de un ciclo de centrifugado único de sangre periférica que se activa con Cloruro de Calcio. Los factores de crecimiento son proteínas que mejorarían la regeneración del tejido al aumentar la mitosis, diferenciación y proliferación celular. El objetivo de este trabajo es valorar el proceso de neovascularización en la cicatrización de colgajos cutáneos en conejos, con el uso de PRFC con diseño de tipo experimental. El PRFC se obtuvo de cada animal por centrifugación de sangre venosa (1800 rpm, 8 min). En cada conejo (n:10) se realizaron quirúrgicamente dos colgajos uno a cada lado de la línea media, al derecho se le aplicó PRFC y al izquierdo solución fisiológica como control. Se separaron en dos grupos, en el grupo 1 (n:5) se realizaron observaciones macroscópicas, mediante registro fotográfico, durante 7 días y en el grupo 2 (n:5) se realizaron biopsias de piel a los 7, 15 y 30 días postratamiento, en las que se evaluó la neovascularización analizando el número de vasos sanguíneos por observación directa al microscopio óptico. Los resultados se expresaron por métodos estadísticos. En la evaluación macroscópica para la viabilidad de la piel, los colgajos de piel tratados con PRFC presentaron mayor media de supervivencia (88%) que los controles (65%). En la evaluación histológica los valores medios obtenidos para vasos sanguíneos en los colgajos cutáneos con PRFC demostró valores significativamente mayores ($p < 0.05$) que los controles durante todos los días. En conclusión, de acuerdo con el modelo evaluado y los valores promedio obtenidos, el PRFC infiere una respuesta satisfactoria en la neovascularización y en consecuencia, favorece la viabilidad de colgajos cutáneos en conejos.

Palabras clave: piel, colgajo, neo vascularización, cicatrización, necrosis, PRFC.

SUMMARY

In reconstructive surgery the most feared complication in the healing of a skin flap is a significant area of necrosis, is cell death due to lack of nutrients, which causes the failure of the surgical procedure performed. A therapeutic option to improve tissue survival is the use of Plasma Rich in Growth Factors (PRFC), an autologous plasma volume that has twice the platelet physiological plasma concentration (200,000 platelets / μ l) obtained through a cycle of single peripheral blood centrifugation that is activated with calcium chloride. The Growth Factors are proteins that would improve tissue regeneration by increasing mitosis, cell differentiation and proliferation. The objective of this work is to evaluate the process of neovascularization in the healing of cutaneous flaps in rabbits, with the use of PRFC. Experimental type design The PRFC was obtained from each animal by venous blood centrifugation (1800 rpm, 8 min). Two flaps were performed surgically in each rabbit (n:10), one on each side of the midline, the right one was given PRFC and the left physiological solution as control. They were separated into two groups, in group 1 (n:5) macroscopic observations were made, through photographic record, for 7 days and in group 2 (n:5) skin biopsies were performed at 7, 15 and 30 days post-treatment, in which neovascularization was evaluated by analyzing the number of blood vessels by direct observation under an optical microscope. The results were expressed by statistical methods. In the macroscopic evaluation for the viability of the skin, the skin flaps treated with PRFC showed a higher average survival (88%) than the controls (65%). In the histological evaluation, the mean values obtained for blood vessels in the skin flaps with PRFC showed significantly higher values ($p < 0.05$) than the controls during all the days. In conclusion, according to the model evaluated and the average values obtained, the PRFC infers a satisfactory response in neovascularization and consequently favors the viability of cutaneous flaps in rabbits.

Key words: skin, flap, neovascularization, scarring, necrosis, PRFC.

INTRODUCCION

La Medicina Veterinaria ha ido evolucionando y avanzando para obtener los tratamientos que más se adecuen a cada tipo de herida según sus características, tratando de mejorar los resultados. Debemos recordar que, como cada paciente, cada herida es única y debe tratarse como tal. La falta de conocimiento sobre cómo cicatrizan las heridas puede originar un cuidado postoperatorio incorrecto con probables complicaciones (Pavletic, 1991; Tracy, 2003).

Una herida es una lesión con pérdida de continuidad de la piel o mucosa, que puede afectar o no a los tejidos subyacentes, producida por acción de diversos agentes causales (Tracy 2003; Sopena Juncosa *et al.*, 2009; Pavletic, 2011).

Inmediatamente después de ocurrida una lesión o incisión cutánea, comienza el proceso de cicatrización, una combinación de eventos físicos, químicos y celulares que conduce a la regeneración del epitelio reemplazando la dermis por tejido fibroso, el cual está formado por colágeno con características diferentes al colágeno original. Estas fibras de colágeno nuevas son más cortas y desorganizadas siendo la causa de que una cicatriz nunca presente la fuerza tensora que posee la piel sana (Fossum, 2000).

La curación de una herida puede ser reparativa o regenerativa. La reparación es cuando el tejido es sustituido por otro similar, pero no idéntico; por el contrario, regeneración es la completa reconstitución del tejido dañado. En ambas modalidades, se lleva a cabo un proceso que involucra a diferentes células y factores de crecimiento (FC) tal lo mencionan distintos autores (Grovetti *et al.*, 2004; Orozco *et al.*, 2010). La terapia regenerativa pretende lograr el predominio de fenómenos regeneradores sobre reparadores, es decir la restitución anatómica y funcional versus la cicatriz fibrosa, mediante la aplicación de agentes inductores celulares como los FC. Una terapia regenerativa eficaz, lleva implícita una rápida resolución de síntomas y reducción de los índices de recaída (Orozco *et al.*, 2010).

La regeneración de un tejido exige la formación de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis permitirá la llegada de células tronco multilineales y proporcionará factores tróficos necesarios para la homeostasis celular (Anitua, 1999).

El tiempo de cicatrización y la calidad del proceso cicatrizal, así como las características de la cicatriz formada se ha constituido en un tema de investigación apasionante tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, especialmente relacionado con el uso de

Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC); desde la década de 1970 cuando fue descubierto por el Dr. Eduardo Anitua.

Los FC son un grupo de sustancias de naturaleza polipeptídica, solubles y difusibles, que tienen la capacidad de regular el crecimiento, la diferenciación y el fenotipo de numerosas células (Vega *et al.*, 2000). Estos FC proporcionan las señales iniciales para la activación de las células integrantes de los tejidos que los rodean. Como respuesta a esas señales las células locales y las infiltradas sufren cambios en la proliferación, diferenciación y síntesis de proteínas con diversas funciones biológicas. En conjunto, todos estos fenómenos, definen el proceso conocido como activación celular (Reed, 2002).

El uso de derivados plasmáticos fue introducido por Marx en 1986, principalmente para su uso en cirugía maxilofacial y oral. Inicialmente se desarrolló el adhesivo de fibrina ante la necesidad de mejorar los agentes hemostáticos y los adhesivos quirúrgicos. Matras describió este adhesivo como una sustancia con propiedades selladoras y hemostáticas que promovían el cierre y la reparación del tejido de una manera más rápida (Matras, 1982).

Posteriormente, se desarrolló la obtención de fibrinógeno autólogo, el cual evitaba riesgos de infección y rechazo, pero se debía extraer sangre del paciente unos días antes de la intervención quirúrgica para que el laboratorio obtuviera el gel de fibrina. Por este último inconveniente se desarrolló el plasma rico en plaquetas (PRP), el cual puede obtenerse minutos antes de comenzar. Se obtenía 500 ml de sangre del paciente y ésta se sometía a doble centrifugación. En el momento en que se requería, la sangre se activaba con Cloruro de Calcio y trombina bovina para formar un gel rico en plaquetas. Durante la activación se producían agregación y degranulación plaquetaria, con lo cual se liberaban las proteínas contenidas en sus gránulos como los FC (Marx *et al.*, 1998).

Los resultados satisfactorios del PRP originaron una nueva técnica para obtener de manera más rápida, con menor cantidad de sangre y puramente autóloga, el conocido PRFC, esta nueva técnica continuaba basándose en grandes concentraciones plaquetarias, ya que funcionan como transportadoras de grandes cantidades de FC y de otras sustancias, como la fibronectina. La aplicación del gel en el sitio de la herida orienta la concentración de dichas sustancias para acelerar el proceso de reparación y regeneración tisular (Anitua, 1999).

El PRFC fue introducido por Whitman en 1997. Se decía que, a través de la activación de las plaquetas en un gel, se liberaban FC que mejorarían la regeneración al aumentar la

mitosis, la producción de colágeno o la diferenciación celular; todo ello crucial en la reparación de las heridas. El PRFC es un volumen de plasma autólogo que posee al menos el doble de la concentración plasmática fisiológica plaquetaria (200.000 plaquetas/ μ l) que se obtiene a través de un ciclo de centrifugado único, con parámetros de tiempo y velocidad establecidos, a partir de una muestra de sangre periférica activada con Cloruro de Calcio (Collins, 2000).

Se ha demostrado que al aislar y aplicar las proteínas responsables de la cicatrización de heridas y de la regeneración de tejidos, en determinada zona a tratar, el proceso de reparación se acelera y también disminuyen las complicaciones postquirúrgicas como el dolor y la inflamación, optimizando la capacidad de regeneración del organismo (Anitua, 1999).

Datos clínicos revelan que el PRFC actuaría como una matriz favorable para el desarrollo de la cicatriz, evitando procesos inflamatorios excesivos y generando la liberación de citoquinas (Dohan *et al.*, 2006). El PRFC favorece la proliferación de fibroblastos (Bertone *et al.*, 2016) la síntesis de Colágeno tipo 1 (Liu *et al.*, 2002) estimulando además procesos como la angiogénesis, mitogénesis y el crecimiento del tejido epitelial (Rozman y Bolta, 2007).

En el contexto del bienestar animal, la posibilidad de acortar el tiempo y mejorar la calidad del proceso de cicatrización y disminuir el dolor luego de haber sufrido pérdida de continuidad cutánea, se convierte en una alternativa interesante, tanto para los propietarios como para los mismos pacientes.

Los Médicos Veterinarios podrían contar entre las alternativas terapéuticas y de manejo situacional en su práctica diaria, con propuestas surgidas de los resultados de la presente investigación. La relativa facilidad de obtención del PRFC y su aplicación sobre las heridas en la piel hacen de esta, una técnica terapéutica alternativa con excelentes resultados. Al ser un volumen de plasma extraído del propio paciente, no es tóxico ni inmunorreactivo aprovechando de esta manera su propia capacidad regenerativa.

Por lo tanto, PRFC representa una terapia biológica prometedora, que ofrece oportunidades para diversas aplicaciones en el tratamiento de heridas, úlceras y otras formas de regeneración en medicina (Rozman y Bolta, 2007).

MARCO TEORICO

1.1. La piel

1.1.1. Funciones y propiedades

La piel es el órgano más grande del cuerpo y sirve como primera línea de defensa contra microorganismos, actúa como receptor sensorial para el tacto, presión, vibración, dolor, calor y frío; produce vitamina D, almacena agua, grasa, electrolitos, carbohidratos y proteínas funcionando también como barrera contra la radiación y los químicos (Pavletic, 2011).

1.1.2. Histología

La piel está compuesta por dos capas: epidermis y dermis y por anexos asociados. La epidermis es la capa más externa, está representada por un epitelio plano estratificado queratinizado, es delgada pero protectora; especialmente fina en las áreas con pelo abundante y algo más densa en zonas con menor cobertura pilosa. Este epitelio es avascular pero recibe nutrientes provenientes del líquido que penetra desde los capilares dérmicos y estratos más profundos. Por debajo, se encuentra la dermis, un tejido conectivo que varía de laxo a denso, es vascular brindándole nutrición y sostén a la epidermis. Está compuesta por fibras colágenas, reticulares y elásticas circundadas por una sustancia fundamental de mucopolisacáridos. A lo largo de toda esta capa existen fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas, células cebadas y estructuras como vasos linfáticos, nervios, folículos pilosos, glándulas, conductos y fibras de músculo liso (Fossum, 2000).

1.1.3. Circulación

Con respecto a la circulación cutánea existen dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis es el proceso donde los vasos sanguíneos son construidos de novo, a partir de la placa mesodérmica lateral donde los hemangioblastos formados a partir de estas células mesodérmicas espláncnicas, se condensan en “islas de sangre” donde las células internas se vuelven células madres hematopoyéticas, precursoras de las células sanguíneas y las externas se vuelven angioblastos, que se diferenciarán posteriormente en células endoteliales y los tubos endoteliales se formaran e interconectaran para formar un plexo capilar primario. El otro proceso, la angiogénesis, es aquel en que la red capilar primaria se remodela y se separa en distintas arterias, venas y lechos capilares (Pavletic, 2011).

1.1.4. Afecciones

La piel puede lesionarse a través de una herida la cual es resultado de la absorción de energía transferida al cuerpo proveniente de un agente tal como un arma, corriente eléctrica, radiación solar o el bisturí de un cirujano. La gravedad de la lesión depende de la fuerza de la fuente energética, de cómo se dispersa hacia el cuerpo y de la región de tegumento que la absorba (Pavletic, 2011). Esta solución de continuidad, puede finalmente conducir a una discapacidad grave o incluso la muerte por complicaciones agregadas no controladas que pueden ser a nivel local, como úlceras, o bien generales y así llevar a graves trastornos sistémicos tales como hipovolemia, deshidratación o septicemia (Ramírez Hernández, 2010).

1.2. Herida

1.2.1. Concepto

Una herida es definida como aquella ruptura o pérdida de continuidad anatómica y celular del tejido cutáneo (Pavletic, 2011). Luego de este evento, la integridad de la piel debe reestablecerse rápidamente a través del proceso de cicatrización, con el fin de mantener la homeostasis y prevenir complicaciones como infección, pérdida de tejidos y fluidos, entre otras (Eming *et al.*, 2007).

1.3. Cicatrización

1.3.1. Definición

Es un proceso biológico que comprende la combinación de complejos mecanismos celulares, moleculares, fisiológicos y bioquímicos, que por medio de quimiotaxis, proliferación, depósito y reorganización de la matriz extracelular, llevaran a la reparación o incluso a la regeneración de tejidos lesionados. Una herida debe cerrar en un orden preciso para evitar respuestas exageradas o retardadas (Diegelmann y Evans, 2004).

1.3.2. Fases de la cicatrización

El proceso de cicatrización comienza inmediatamente ocurrida una lesión o incisión; consta de las siguientes fases: fase inflamatoria, de desbridamiento o proliferativa, de reparación y de maduración (Fossum, 2000). Sin embargo, estas fases no se excluyen entre sí, sino que se superponen en el tiempo. Cada fase es regulada por citoquinas como los factores de crecimiento

(FC) que se unen a receptores de superficie celular y que sirven como reguladores de la función y del crecimiento celular. Las citoquinas pueden actuar en las células responsables de su liberación es decir autócrina; en células adyacentes, parácrina o en células distantes, endócrina (Pavletic; 2011).

1.3.2.1. Fase inflamatoria

La fase inflamatoria se caracteriza por vasodilatación y extravasación de suero, con migración de neutrófilos a la herida, atraídos por factores quimiotácticos específicos facilitando la marginación vascular y la posterior diapédesis (Clark, 1990). Una vez que los neutrófilos migran al intersticio inician la fagocitosis de bacterias y proteínas de la matriz por medio de enzimas específicas como hidrolasas, proteasas y lisozimas además de la liberación de radicales libres de oxígeno (Hunt, 1983).

La hemostasia y coagulación se inicia con una vasoconstricción momentánea durante 5 a 10 minutos y activación de los elementos celulares de la sangre que lleva a la formación del coágulo a través de la cascada de la coagulación y el fenómeno de agregación plaquetaria (Kirsner y Eaglstein, 1993).

La formación del coágulo lleva a la activación de trombina, enzima que transforma el fibrinógeno en fibrina promoviendo la coagulación además de activar las plaquetas. La activación plaquetaria provoca la formación de un tapón plaquetario y un coágulo hemático, cuyas funciones son la hemostasia y secreción de proteínas biológicamente activas involucradas en el proceso de reparación tisular. Estas proteínas, los FC, son secretadas básicamente por la estructura plaquetaria, pero no de manera exclusiva, pudiendo ser producidas también por distintas células como el fibroblasto (Flores *et al.*, 2012). Estas sustancias son sintetizadas por el megacariocito, ya que la plaqueta no contiene núcleo, ni los elementos necesarios para la síntesis proteica (Rodríguez, 2003).

El coágulo de fibrina y la fibronectina proveen una matriz inicial que favorece la migración de las células sanguíneas, principalmente monocitos, como también fibroblastos y queratinocitos, además de intervenir en la respuesta inflamatoria por medio de la bradiquinina y las fracciones C3a y C5a del complemento, los cuales aumentan la permeabilidad vascular y promueven la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos (Leibovich y Ross, 1975). Los mediadores inflamatorios como histamina, serotonina, enzimas proteolíticas, cininas, prostaglandinas, complemento, enzimas lisosomales, tromboxano y FC inducen el proceso flogístico que dura aproximadamente 5 días (Fossum, 2000).

Los neutrófilos en degeneración, eliminan enzimas que facilitan la desintegración de detritos y estimulan a los monocitos a transformarse en macrófagos, a las 24- 48 horas de la lesión. Los macrófagos reclutan células mesenquimáticas, estimulan la angiogénesis y modulan la producción de matriz dentro de las heridas (Fossum, 2000). Los neutrófilos dentro del tejido experimentan muerte celular programada también llamada apoptosis, a los pocos días (Pavletic, 2011).

Los signos clásicos de la inflamación como el enrojecimiento, calor, dolor y tumefacción son resultado de la vasodilatación, el escape de fluidos y la obstrucción de los canales linfáticos locales. Los vasos linfáticos son frágiles; la fibrina formada en el lugar de la herida puede obstruirlos y aumentar la retención de líquido local (Pavletic, 2011).

1.3.2.2. Fase proliferativa

La fase proliferativa comienza 24 horas posteriores a la ocurrencia de la lesión. Histológicamente existen cuatro procesos asociados a esta fase: fibroplasia y depósito de colágeno; neovascularización, angiogénesis; epitelización y contracción de la herida (Fossum, 2000).

En la primera etapa, a partir de los fibroblastos de la dermis, ocurre la síntesis de fibras colágenas que van ocupando el espacio correspondiente a la nueva dermis. Durante la etapa siguiente, se forman nuevos capilares a partir de células endoteliales que migran hacia el tejido cicatrizal estimulados por la combinación de moléculas endógenas como heparina, fibronectina, ácido láctico y FC. En la reepitelización, los queratinocitos basales de los bordes de la herida, se aplanan y migran para cubrir el tejido de granulación que está en formación (Collins, 2000).

1.3.2.2.1. Fibroplasia

Los macrófagos estimulan al ADN y la proliferación de fibroblastos, estos se originan a partir de células mesenquimáticas indiferenciadas en el tejido conjuntivo circundante y migran hacia la herida siguiendo las bandas fibrinosas en el coágulo de fibrina, por delante de los nuevos brotes de capilares y así comienzan a sintetizar y depositar colágeno, elastina, proteoglicanos que maduran en tejido fibroso. La fibrina desaparece a medida que se deposita el colágeno aumentando así la resistencia a la tracción. La fase fibroblástica dura entre 2 a 4 semanas (Fossum, 2000).

1.3.2.2.2. Neovascularización

Un suceso clave en el proceso de cicatrización es la formación de nuevos vasos sanguíneos, la angiogénesis ya que, sin la circulación adecuada, los fibroblastos no pueden sobrevivir en el ambiente de la herida. Es un proceso complejo y depende de cuatro fenómenos interrelacionados: alteración del fenotipo celular, migración guiada por quimioattractivos, estimulación mitogénica y desarrollo local de una matriz extracelular de sostén. La angiogénesis es potenciada por el ambiente lesional, que incluye la presencia de baja tensión de oxígeno, aminas biogénicas y ácido láctico. Es probable que la baja tensión de oxígeno estimule los macrófagos para producir y secretar factores angiogénicos (Pavletic, 2011).

Los capilares invaden por detrás de los fibroblastos migratorios. Los brotes capilares se originan a partir de los vasos sanguíneos existentes y se unen con otros o con vasos dañados. Los neocapilares aumentan la tensión de oxígeno, lo cual promueve la fibroplasia. La actividad mitótica en las células mesenquimáticas adyacentes se incrementa cuando comienza a fluir la sangre de los neocapilares (Fossum, 2000). La formación de nueva vasculatura cutánea reestablece el suministro de nutrientes para la regeneración del tejido y de esta manera promueve la fibroplasia y previene la hipoxia tisular (Bauer *et al.*, 2005).

Los FC angiogénicos son el factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de origen epidérmico (EGF). Las células endoteliales proyectan pseudópodos a través de la membrana basal debilitada y migran hacia el espacio perivascular hacia el segundo o tercer día después de la lesión y sirven como una fuente celular durante la angiogénesis. Las yemas capilares se extienden hacia la matriz, donde sus puntas finalmente se ramifican y conectan formando asas capilares y de allí plexos capilares (Bauer *et al.*, 2005).

La combinación de neocapilares, fibroblastos y tejido fibroso en la cicatrización por segunda intención forma un tejido de granulación de color rojo, 3 a 5 días post lesión, que se coloca en cada borde y crece 0,4 a 1 mm por día. Funciona como barrera contra la infección, superficie para la migración epitelial y además es fuente de miofibroblastos, responsables de la contracción de la herida (Pavletic, 2011).

1.3.2.2.3. Epitelización

La epitelización comienza, en una herida abierta, una vez formado el tejido de granulación, a los 4 a 5 días, donde las células se agrandan, se aplanan perdiendo su fijación a la membrana basal, extendiendo pseudópodos y dirigiéndose por debajo de la escara liberando

colagenasas para desprenderla. Este proceso culmina por inhibición por contacto de las células entre sí (Fossum, 2000).

1.3.2.3. Fase madurativa

Durante la transición de tejido de granulación a maduración cicatrizal, se produce la remodelación del colágeno, donde la tasa de síntesis del mismo se iguala con la de su lisis. El colágeno tipo III disminuye gradualmente, mientras que el colágeno tipo I aumenta, dándole así más resistencia a la tracción a la herida. El resultado final, es menos colágeno que el que se observa en el proceso de cicatrización temprana, pero con una configuración superior a nivel estructural, es decir, haces de colágeno más grandes y mayor entrecruzamiento entre los mismos (Ramírez Hernández, 2010).

1.3.3. Factores locales y generales que influyen en el proceso de cicatrización

1.3.3.1. Factores locales y generales que retrasan el proceso de cicatrización

Se ha demostrado la influencia positiva o negativa de factores locales y/o generales sobre el proceso de cicatrización de tejidos. Ciertos factores locales deterioran la resistencia a la infección como los cuerpos extraños, el tejido necrótico o isquémico, cierre de heridas bajo tensión, la irradiación, presencia de hematomas o seromas, espacios muertos, uso de material de sutura inapropiado o en excesiva cantidad, número y especie de bacterias presentes y la forma en la cual se produjo la herida (Slatter, 2006).

El tejido necrótico proporciona un medio para el desarrollo bacteriano e inhibe la fagocitosis leucocítica de las bacterias; la isquemia también afecta al producir hipoxia y dificultar el reclutamiento leucocitario. También puede estar disminuida la cicatrización por factores sistémicos como la edad, estado inmunológico, nutrición, enfermedades como la Diabetes Mellitus no controlada, enfermedad de Cushing, hipoproteïnemia, anemia, uremia, shock hipovolémico, agentes farmacológicos como corticosteroides y quimioterápicos; donde los esteroides suprimen la fibroplasia y neovascularización, y los quimioterápicos interfieren con la síntesis proteica, disminuyen la fibroplasia y el depósito de colágeno (Slatter, 2006).

1.3.3.2. Factores locales y generales que aceleran el proceso de cicatrización

Existen factores que aceleran la cicatrización como la hidratación la cual es muy importante, las heridas en ambiente húmedo cicatrizan mucho más rápido que las heridas secas.

El exudado de la herida, en ausencia de infección, es rico en FC y enzimas que proveen una cicatrización óptima (Barreira Macedo y Carriquiry, 2006). El ambiente húmedo tiene efectos biológicos tales como prevenir la desecación tisular, favorecer la migración celular y la angiogénesis, estimular la síntesis de colágeno y favorecer la comunicación intercelular, lo que se traduce en un aumento de la velocidad de cicatrización y una mejor calidad de cicatriz (Flores Montes, 2006).

1.4. Tipos de cicatrización de heridas

Existen distintas maneras de cicatrización o cierres de una herida según el período y la forma en que ésta ocurra.

1.4.1. Cicatrización primaria o por primera intención:

El cierre primario se realiza con el empleo de sutura en una herida creada de forma reciente, sin contaminación ni cuerpos extraños, siendo una herida sangrante, cortante o incisa. Además, es necesario disponer de piel adyacente para cerrar la herida afrontando sus bordes sin excesiva tensión (Pavletic, 2011). Es la ideal para cualquier cirujano donde los tejidos cicatrizan por unión primaria obteniéndose un mínimo edema, sin secreción local ni separación de los bordes y con la formación de una cicatriz de reducido tamaño en un tiempo breve (Salem *et al.*, 2000).

1.4.2. Cicatrización secundaria o por segunda intención:

En el cierre secundario no se realiza ningún tipo de sutura, se deja la herida abierta ya que no es posible afrontar los bordes en heridas muy contaminadas, entonces se lleva cabo un proceso de cicatrización prolongado y más complicado. La herida cicatrizará desde las capas más profundas y desde sus bordes formándose tejido de granulación como relleno que contiene miofibroblastos responsables de la contracción y cierre cutáneo. El proceso de cicatrización es lento y generalmente deja una cicatriz inestética (Salem *et al.*, 2000).

1.4.3. Cicatrización terciaria o por tercera intención:

En el caso de heridas que cumplen con los criterios para ser suturadas, pero que al ser tan extensas sus bordes no se pueden afrontar fácilmente, se elige la cicatrización por cierre terciario. Por lo tanto, se utilizan colgajos cutáneos es decir segmentos de piel removidos parcialmente para cubrir el defecto (Pavletic, 2011).

1.4.4. Cicatrización por cuarta intención:

El cierre por cuarta intención se refiere al uso de injertos libres para cubrir una herida limpia cuyos bordes tampoco pueden ser afrontados. Es un concepto nuevo, por lo tanto, algunos autores no lo incluyen en su clasificación, o bien incluyen a los injertos dentro de los cierres por tercera intención (García Escobar, 2009). Un injerto cutáneo es un segmento de epidermis y dermis que es removido totalmente de su lugar de origen, a diferencia de un colgajo y es transferido al sitio receptor donde se encuentra el defecto. Los mismos pueden ser de espesor completo o parcial, según la porción de dermis que incluyan. Para esto, se realizan distintas técnicas quirúrgicas (Fernández González *et al.*, 1988).

1.5. Colgajos cutáneos

1.5.1. Definición y clasificación:

Un colgajo cutáneo es piel y tejido sano que se desprende parcialmente y se traslada para cubrir una herida cercana. Los colgajos pueden ser clasificados según su localización, irrigación y formación tisular. Dentro de ellos, los colgajos pediculados son “lenguas” de epidermis y dermis que se desprenden parcialmente desde sitios dadores cuya base o pedículo contiene la irrigación sanguínea esencial para su supervivencia. Con respecto a la irrigación, la mayoría de los colgajos son denominados colgajos del plexo subdérmico; sin embargo, aquellos con vasos cutáneos directos son designados como colgajos de molde axial (Fossum, 2000).

El colgajo de avance es un tipo de colgajo del plexo subdérmico local que se forman en piel elástica, laxa, adyacente para que puede ser deslizada sobre el defecto (Fossum, 2000). Se desarrolla en paralelo a las líneas de menor tensión para facilitar el estiramiento hacia adelante por sobre la herida, cerrando luego por primera intención (Pavletic, 2011).

1.5.2. Complicaciones

La complicación más temida en la cicatrización de un colgajo de piel, es un área significativa de necrosis, es decir la muerte celular por falta de nutrientes, que causa el fracaso del procedimiento quirúrgico realizado. La frecuencia estimada de necrosis en colgajos cutáneos varía entre el 2 y el 20% de los casos en que se llevan a cabo (Lebas *et al.*, 2013).

La supervivencia de los colgajos depende del flujo circulatorio a través de sus tejidos, por eso la circulación debe ser preservada minimizando la tensión y el retorcimiento (Slatter, 2006).

Aunque la necrosis del colgajo puede ser resultado de infección o agentes tóxicos, una irrigación inadecuada es la causa principal en la mayoría de los casos. Es necesaria una suficiente presión de perfusión para conducir la sangre hacia la porción distante del colgajo y así evitar la necrosis. La obstrucción arterial, principalmente o venosa completa de un colgajo causa necrosis (Slatter, 2006).

Los múltiples factores que contribuyen a la mala circulación subrayan la importancia de una técnica quirúrgica atraumática, con la adecuada asepsia, hemostasia y una cuidadosa transferencia del colgajo. El trauma quirúrgico, la sección innecesaria de canales vasculares cutáneos, excesivo edema, retorcimiento, hematomas, infección e inadecuadas técnicas de vendaje tienen efectos negativos en la supervivencia de un colgajo cutáneo (Slatter, 2006).

La piel viable ha sido definida macroscópicamente como rosada, caliente y suave al tacto mientras que la necrótica es de color marrón negrozca, fría y gruesa a la manipulación (Pires Camargo *et al.*, 2014).

La necrosis de un colgajo puede no ser evidente hasta los 6 días postquirúrgicos y es más probable cuando son muy largos o muy estrechos, cuando están expuestos a tensión o movimiento excesivo o cuando son traumatizados en la elevación del tejido durante o después de la cirugía. El incremento del ancho de un colgajo no aumenta su supervivencia, no obstante, estrechando la base del pedículo, se incrementa la posibilidad de necrosis. La base de los colgajos debe ser ligeramente más amplia que el ancho de su cuerpo (Fossum, 2000).

1.6. Plaquetas

1.6.1. Definición

Las plaquetas o trombocitos son células anucleadas discoidales de la sangre periférica de pequeño tamaño (2 a 4 μm diámetro) que tienen una función primordial en el proceso de la hemostasia, regeneración de tejidos y en la defensa inmunológica. Dentro de la hemostasia, la hemostasia primaria es el proceso inicial de la coagulación y tiene el objeto de crear un tapón plaquetario en respuesta al daño del endotelio vascular y consiste en cuatro fases: adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria. El recuento normal se sitúa entre 150.000 a 450.000/ μl (Freymiller, 2004).

1.6.2. Función

Cuando se produce una herida, a la membrana plaquetaria se une el factor plasmático de Von Willebrand que hace de puente entre el colágeno expuesto de la pared vascular y las plaquetas produciéndose la adhesión plaquetaria al endotelio. La agregación entre unas y otras plaquetas se hace a través de puentes de fibrinógeno entre glicoproteínas de membrana produciéndose el tapón plaquetario. La activación y degranulación de las plaquetas se puede realizar por la adhesión de las mismas al colágeno y otros componentes del subendotelio o por la presencia de trombina. Todos los mecanismos de activación plaquetaria lo hacen activando fosfolipasas de membrana celular que promueven la liberación de calcio, el cual produce agregación y secreción. La degranulación plaquetaria libera tromboxano A₂, adenosindifosfato y serotonina que estimulan el reclutamiento y activación de las plaquetas circundantes. También van a contener fibrinógeno, fibronectina e interleuquinas. Cuando se activan las plaquetas asumen una morfología esferoidal y espinosa con movimientos de pseudópodos y expulsión de los gránulos (Esnaola, 1998).

1.6.3. Composición

Las plaquetas están repletas de gránulos secretorios, que son indispensables para que cumplan con sus funciones. Entre los tres tipos de gránulos secretorios se encuentran los gránulos α , gránulos o cuerpos densos y lisosomas. De ellos, los más abundantes son los gránulos α , los cuales poseen un contenido importante de proteínas, mediadores solubles tales como citoquinas, FC, entre estos últimos, se encuentran proteínas pro y anti-angiogénicas (Blair y Flaumenhaft, 2009).

Las plaquetas son consideradas depósitos de vida endógena de una amplia gama de FC. La técnica de obtención del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) permite aprovechar su potencial para la reparación de heridas en diferentes aplicaciones terapéuticas (Anitua *et al.*, 2011).

Las plaquetas comienzan a secretar activamente estas sustancias 10 minutos después de la formación del coágulo, liberándose más del 95% de los FC presintetizados en el lapso de 1 hora. Tras esta liberación proteica masiva, las plaquetas sintetizan y secretan proteínas de forma adicional durante 5 a 10 días más. Cuando la influencia de las plaquetas comienza a remitir, los macrófagos que han llegado al foco, asumen la regulación de la reparación tisular mediante la secreción de sus propios factores (Eppley *et al.*, 2004).

1.7. Factores de crecimiento

1.7.1. Definición

Los FC son proteínas presentes en gránulos y secretadas por las plaquetas que tienen la capacidad para regular funciones celulares importantes como son la proliferación, migración y diferenciación celular, apoptosis y síntesis de matriz extracelular, todos ellos procesos esenciales en la regeneración y en la reparación tisular (Sánchez *et al.*, 2003).

1.7.2. Función

Los FC son primeros mensajeros que se unen a receptores glicoproteicos de membrana para iniciar la transducción de una señal, alcanzan acciones fisiológicas a menor concentración que otros mensajeros como las hormonas y además poseen una variedad mayor de células blanco que éstas (Barbeito y Laube, 2005). Cuando se unen a los receptores; éstos se fosforilan activando cascadas de señalización hacia el interior de la célula, finalizando en la transcripción de genes que codifican para la producción de proteínas, favoreciendo la angiogénesis, revascularización y regeneración de tejidos (Anitua, 2001).

1.7.3. Tipos de factores de crecimiento

- factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF)
- factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
- factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)
- factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF)
- factor de crecimiento epidérmico (EGF)

Los factores que inducen el proceso de neovascularización son el VEGF, EGF y el PDFG (Beca *et al.*, 2007).

1.7.3.1. Factor de crecimiento de origen plaquetario

El PDGF es fuertemente quimiotáctico y posee propiedades mitogénicas para monocitos, neutrófilos, fibroblastos y células del músculo liso. Estimula la angiogénesis, contracción de la herida, formación del tejido de granulación y remodelación de la herida. También induce la producción de fibronectina, ácido hialurónico y metaloproteinasas de la matriz e inhibe la agregación plaquetaria (Pavletic, 2011).

El PDGF promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos por un mecanismo de quimiotaxis, es activador de macrófagos, mitógeno de células mesenquimales y además facilita la formación de colágeno tipo I (Beca *et al.*, 2007).

1.7.3.2. Factor de crecimiento de origen epidérmico

El EGF es derivado de plaquetas, macrófagos, células madre, linfocitos T, células endoteliales, fibroblastos y otros tejidos. Estimula la migración de queratinocitos y la formación de tejido de granulación, además de la angiogénesis, contracción de la herida y el depósito de matriz (Pavletic, 2011).

1.7.3.3. Factor de crecimiento endotelio vascular

El VEGF es responsable de la quimiotaxis y proliferación de células endoteliales, así como también de la hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos. El VEGF es un potencial mitógeno, proapoptótico, quimiotáctico y produce la diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos (Beca *et al.*, 2007).

1.8. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC)

1.8.1. Concepto

Es un preparado autólogo, no tóxico, no alergénico, obtenido por centrifugación sanguínea del paciente, cuya función está directamente ligada a la liberación de los gránulos alfa de las plaquetas, los cuales contienen a los FC (Christgau *et al.*, 2006).

1.8.2. Utilidad

La utilización de PRFC tiene como objetivo mejorar la evolución quirúrgica, reforzando y potenciando el proceso de reparación fisiológica, además de permitir una regeneración más rápida y de mayor calidad en los tejidos conjuntivos dañados (Lieberman y Daluiski, 2002).

1.8.3. Obtención

El PRFC se obtiene a través de un ciclo de centrifugado único, con parámetros de tiempo y velocidad establecidos, a partir de una muestra de sangre periférica activándose con Cloruro de Ca (Collins, 2000). La activación con Cloruro de Calcio del gel plaquetario se basa en la participación del Calcio en el proceso de activación de las plaquetas (Anitua, 2001).

1.8.4. Capacidad regenerativa

Conociendo el rol de los FC en el proceso de cicatrización se empezó a investigar y utilizar concentrados plasmáticos con la intención de ir más allá de la reparación de las heridas quirúrgicas y conseguir regeneración de los tejidos perdidos. La reparación de un tejido es la restauración del mismo, sin que éste conserve su arquitectura original ni su función, produciéndose en este lugar una cicatriz. Por otra parte, se define el término regeneración, cuando la restauración de un tejido posee propiedades indistinguibles al tejido original; por lo que el interés en el PRFC radica en regenerar, reconstruir forma y restaurar función, a través de los FC presentes en las plaquetas (Beca *et al.*, 2007).

Existen dos razones por las que un tejido se repara en vez de regenerarse: la diferencia en la velocidad de reproducción celular del tejido o que puede contener las células necesarias para la regeneración, pero le faltan las señales estimuladoras que desencadenen los acontecimientos necesarios para la regeneración, donde al acelerar este proceso la morbilidad disminuye (Lineaweaver y Lei, 2004).

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Valorar el proceso de neovascularización en la cicatrización de colgajos cutáneos en conejos, con el uso de Plasma Rico en Factores de Crecimiento.

2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Observar diariamente el aspecto macroscópico de los colgajos cutáneos tratados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento hasta el día 7.

2.2.2. Establecer el área de necrosis de los colgajos cutáneos tratados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento al día 7.

2.2.3. Determinar el número de vasos sanguíneos neoformados durante la cicatrización de los colgajos cutáneos tratados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento a los 7, 15 y 30 días postquirúrgicos.

MÉTODOLOGIA

Este trabajo de investigación es parte de un proyecto de investigación PPI (2016-2018) financiado por la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto. El protocolo de trabajo experimental fue aprobado para uso de animales por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Nacional de Río Cuarto (CoEdi). Las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas por el investigador. Para evitar una observación sesgada, la recolección de datos clínicos estuvo a cargo de personal no afectado a las maniobras quirúrgicas.

3.1. Animales de investigación:

Los animales de experimentación son 10 conejos albinos neozelandeses (*Oryctolagus cuniculi*), machos y hembras, con un peso promedio de 4 Kg, clínicamente sanos, divididos en dos grupos y alojados en instalaciones de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

3.2. Obtención de material de estudio:

Se extrae de cada paciente 5cc de sangre venosa autóloga mezclada con solución de citrato de sodio al 3,3 % que se coloca en tubo para realizar una centrifugación diferencial de 1800 rpm durante 8 minutos; se pipetea el tercio de suero sobrenadante a la franja leucocitaria intermedia y se obtiene el PRFC, que se reserva para su posterior uso.

3.3. Protocolo de anestesia:

Xilacina (solución 2%) dosis 0,2 mg/ kg, vía intramuscular

Clohidrato de Ketamina (solución 5%) dosis 50 mg/ kg, vía intramuscular

Diazepam (solución 0.5%) dosis 0,5 mg / kg, vía intramuscular

Citrato de Fentanilo dosis 0,05 mg / kg, vía intramuscular

3.4. Procedimiento quirúrgico:

Se prepara el campo quirúrgico y por cirugía reglada se realiza el procedimiento para realizar un colgajo cutáneo de patrón al azar por deslizamiento de avance en cada lado del dorso del animal. En condiciones asépticas se incide con bisturí dos rectángulos de 10x2 cm, en sentido longitudinal paralelos a la columna vertebral separados ambos por una distancia de 5 cm de la línea media.

El tejido subcutáneo se divulsiona, se levanta el colgajo y se reseca un defecto de piel de 1x2 cm de tamaño, se coloca el material de estudio de la investigación, por inyección intradérmica de la piel del colgajo se aplicará PRFC activado con Cloruro de Calcio en la herida derecha y en la izquierda solución fisiológica de cloruro de sodio, ambos tratamientos se realizan por única vez.

Se sutura con patrón de puntos simples con polipropileno I. Sólo para el caso del Grupo 1 antes de la sutura, para aislar dicho colgajo de su lecho y del contacto con tejido periférico, se colocará una banda plástica, asegurándose que la neovascularización únicamente dependa de la base del colgajo.

3.5. Cuidados posoperatorios y profilaxis antibiótica:

Enrofloxacina (dosis 5 mg / kg, vía intramuscular) y analgesia con Clorhidrato de Nalbufina (dosis 2 mg / kg, vía subcutánea).

3.6. Diseño experimental:

Muestra total de animales (n=10), luego de la técnica quirúrgica se les aplicará PRFC en el colgajo derecho y en el izquierdo solución fisiológica, como testigo. Para evaluar la aplicación del PRFC y control en los colgajos cutáneos se dividen en dos grupos:

Grupo 1 (n:5): para evaluación macroscópica.

Grupo 2 (n:5) para evaluación, mediante biopsias seriadas de efectos celulares microscópicos.

3.7. Parámetros a evaluar y registro de datos:

Grupo 1: diariamente se observa el aspecto de los colgajos realizando un registro fotográfico hasta que se delimiten los cambios de viabilidad tisular evidenciados por la zona de necrosis, se realiza una tabla de observación hasta el día 7.

Grupo 2: examen microscópico de neovascularización durante la cicatrización en los días 7, 15 y 30. Se realizan biopsias insicionales de los bordes de las heridas, comprometiendo espesor total de la piel.

3.8. Preparación de muestras para microscopía óptica y tinción:

Se fijan las muestras en formaldehído en solución acuosa al 10% con el fin de preservar morfología y organización celular. Se deshidratan con baterías de alcohol etílico de graduación creciente (70, 90, 95 y 100 %), se aclaran con xileno y luego se incluyen en parafina. De los tacos obtenidos, se realizan cortes de 4 μm aproximadamente montados en portaobjetos.

Los cortes obtenidos se utilizan para la tinción diferencial de hematoxilina y eosina. Las láminas ya hidratadas se cubren con la solución de hematoxilina durante 5 minutos y se lavan con agua, durante un total de 15 minutos. Luego se cubren con la solución de eosina durante 5 minutos y se lavan rápidamente.

3.9. Análisis de datos:

Los resultados obtenidos por observación macroscópica y técnicas de tinción diferencial serán expresados en forma cuantitativa, analizados y expresados por medio de métodos estadísticos.

RESULTADOS

En la observación macroscópica en el día 7 postoperatorio, los colgajos no se habían retraído del área y las regiones de supervivencia y de necrosis se demarcaron claramente en cada colgajo cutáneo.

La piel viable se observó de un aspecto rosado, blanda al tacto, textura normal y era sangrante cuando se la cortaba con bisturí. En contraste, en el sector necrótico la piel era negra, rígida al tacto y no sangraba cuando se la incidía.

Se observó una media de supervivencia mayor en los tratados que en los controles. Hubo dehiscencia de puntos en controles desde el día 2. En la evaluación macroscópica para la viabilidad de la piel se evaluó el porcentaje de tejido viable, los colgajos de piel tratados con PRFC presentaron mayor media de supervivencia (88%) que los controles (65%).

En las siguientes figuras se muestran ejemplos de dos colgajos representativos, uno experimental y el otro control que ilustra las diferencias entre regiones necróticas y viables.

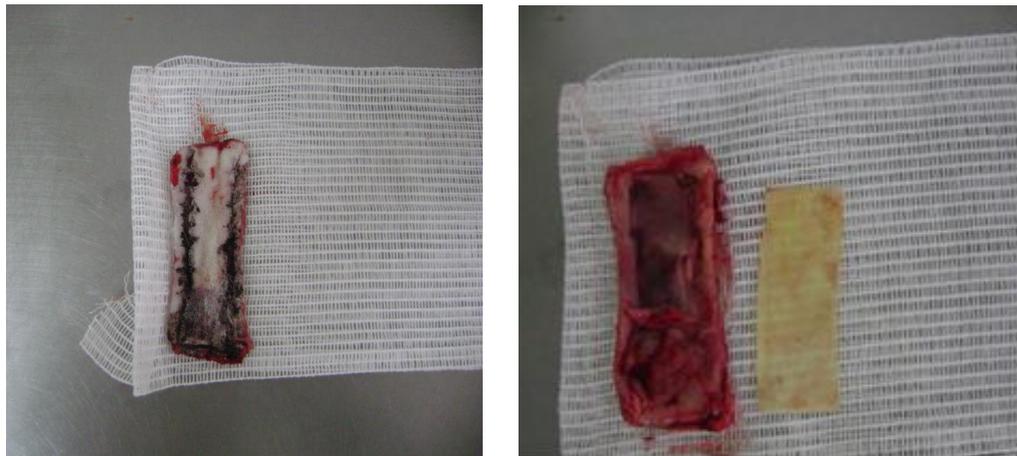


Figura 1. Aspecto macroscópico de colgajo de conejo tratado con PRFC, se observa la viabilidad del tejido. Vista cutánea y vista del subcutáneo, junto a banda plástica empleada en el modelo experimental del grupo 1.

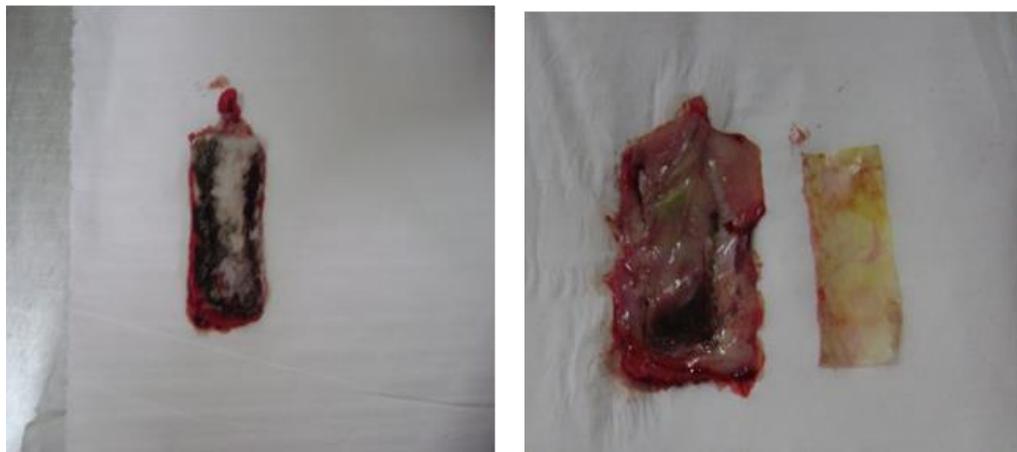


Figura 2. Colgajo de conejo no tratado, se evidencia mayor área de necrosis tisular. Vista cutánea y vista del subcutáneo, junto a banda plástica empleada en el modelo experimental del grupo 1.

En la evaluación histológica al microscopio óptico, se observó la evolución del proceso cicatrizal de colgajos cutáneos a los 7, 15 y 30 días post quirúrgicos, específicamente el efecto del PRFC sobre la neovascularización del tejido en la dermis papilar y reticular.

A los 7 días entre los vasos sanguíneos identificados predominan los vasos preformados en el tejido, pero empiezan a evidenciarse pequeños brotes capilares con presencia de sangre en su interior. En uno de los conejos tratados, a los 7 días se observó un importante engrosamiento de la dermis.

A los 15 días postquirúrgicos se observó mayor número y calibre de los vasos sanguíneos, plexos capilares y una importante cantidad de vasos neoformados y fibroblastos en las muestras de los animales tratados con PRFC.

A los 30 días postratamiento se observan brotes capilares de mayor diámetro conteniendo sangre, abundantes fibrocitos, fibroblastos y queratina sobre todo en los conejos con PRFC.

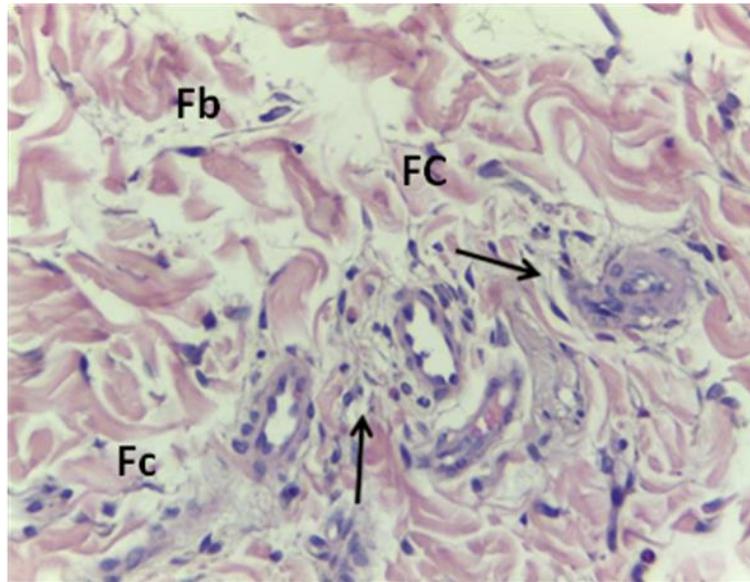


Figura 3. Corte histológico de piel de conejo 1 control a los 7 días post quirúrgico, se observan vasos de gran calibre con sangre en su lumen (flecha), fibras colágenas (FC), fibroblastos (Fb) y fibrocitos (Fc) (Microfotografía 40x).

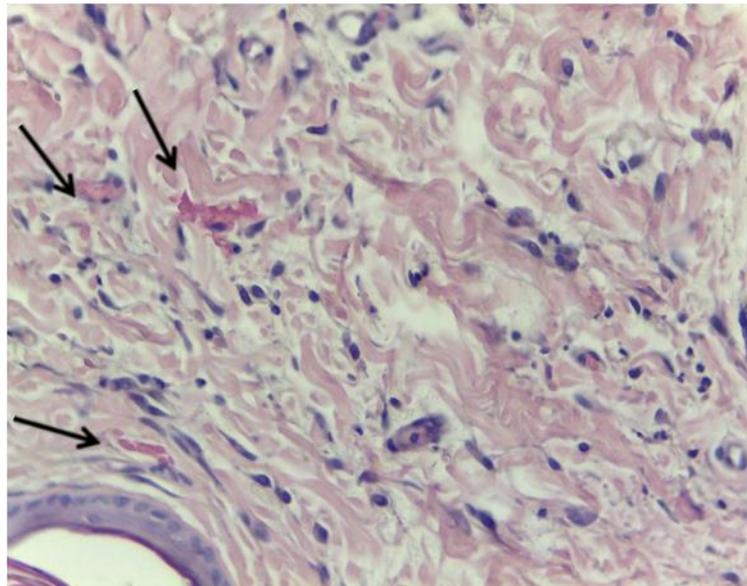


Figura 4. Corte histológico de piel de conejo 1 control a los 7 días post quirúrgicos, se observan pequeñas aglomeraciones de células endoteliales con sangre en su interior (flecha) (Microfotografía 40x).

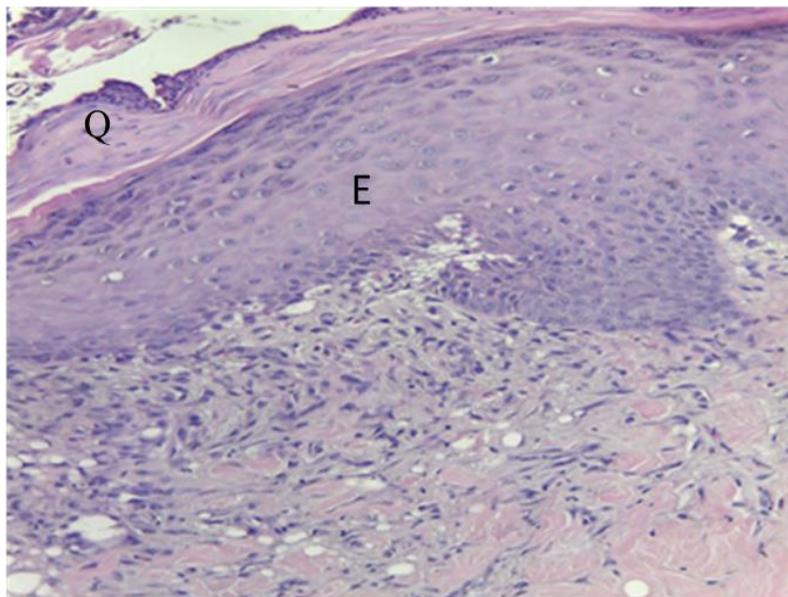


Figura 5. Corte histológico de piel de conejo 1 tratado con PRFC a los 7 días de evolución, se observa importante engrosamiento del epitelio plano estratificado (E) y una gruesa capa de queratina (Q) (Microfotografía 20x).

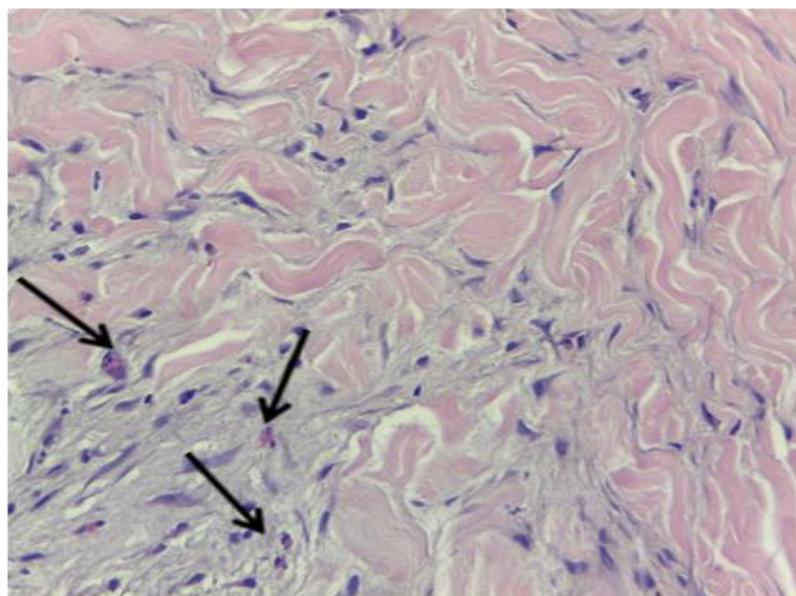


Figura 6. Corte histológico de piel de conejo 1 tratado con plasma a los 7 días donde empiezan a distinguirse pequeños brotes de capilares (flecha) (Microfotografía 40x).

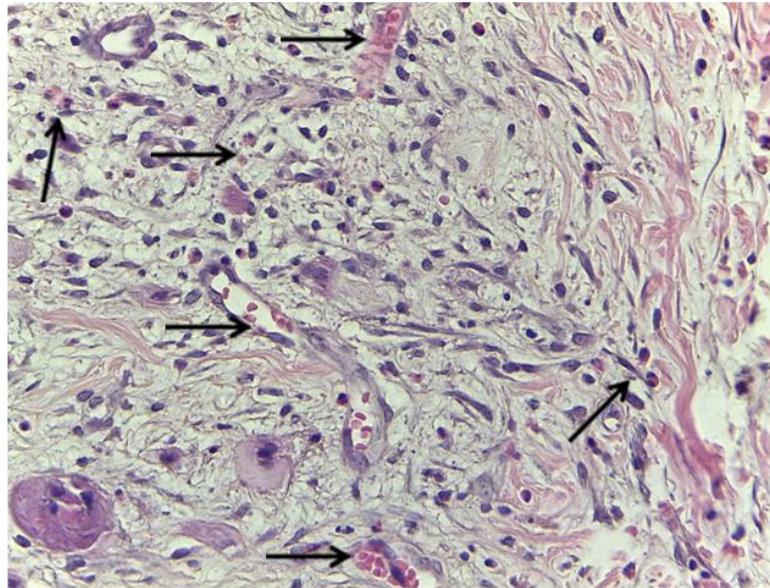


Figura 7. Corte histológico de piel de conejo 1A tratado con PRFC a los 7 días de cicatrización, en este preparado se observó abundante neovascularización como lo muestra las flechas en la imagen (Microfotografía 40x).

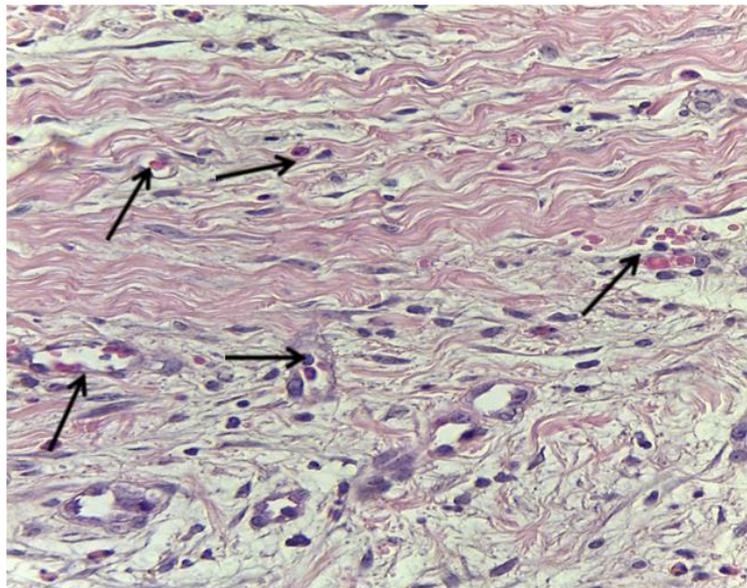


Figura N° 8. Corte histológico de piel de conejo 1A tratado con PRFC a los 7 días de evolución, se observan abundantes vasos sanguíneos (flechas) (Microfotografía 40x).

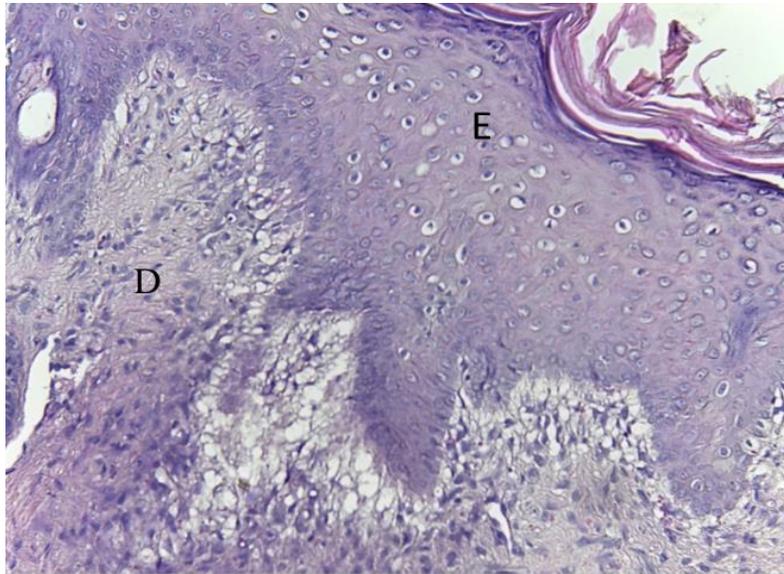


Figura 9. Corte histológico de piel de conejo 1 control a los 15 días donde se observa epidermis (E) y dermis papilar (D) (Microfotografía 20x).

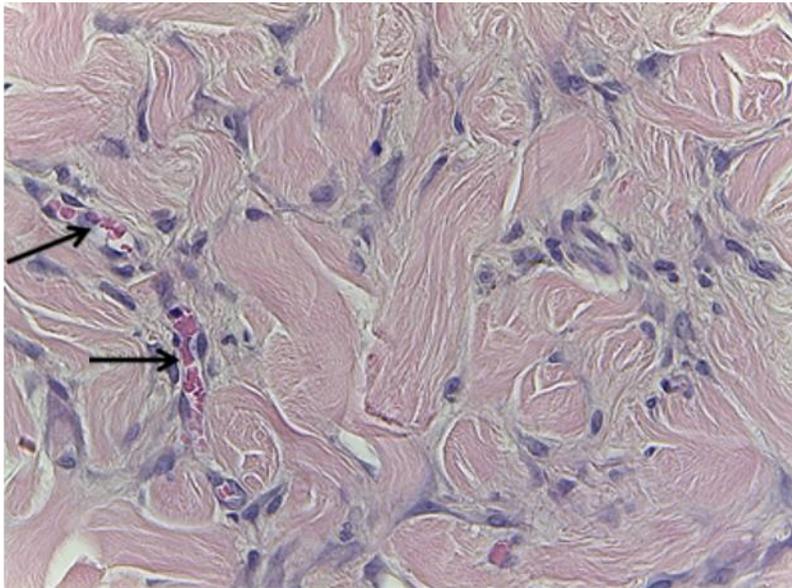


Figura 10. Corte histológico de piel de conejo 1 control a los 15 días de cicatrización, el calibre de los vasos es mayor con respecto a los observados a los 7 días (Microfotografía 40x).

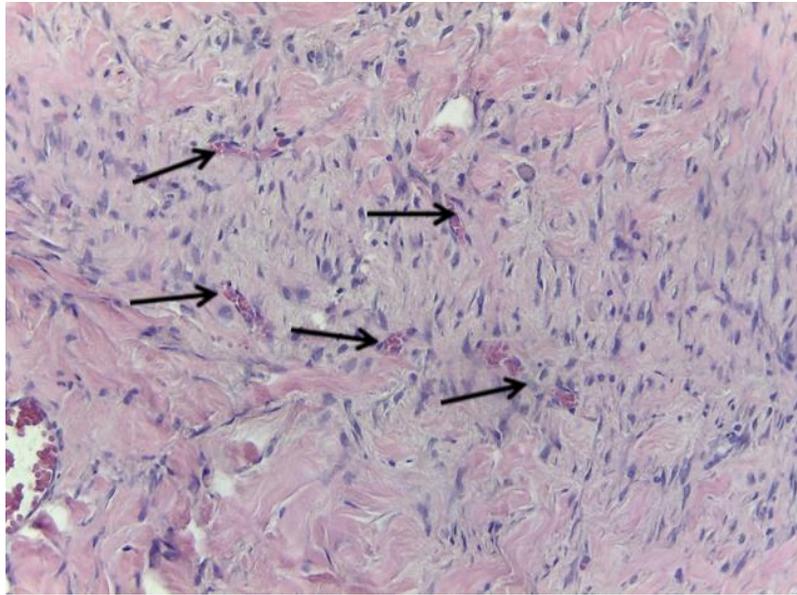


Figura 11. Corte histológico de piel de conejo 1 tratado con PRFC, a los 15 días de la intervención quirúrgica, se aprecian en la imagen numerosos islotes de vasos sanguíneos con mayor calibre (Flechas) (Microfotografía 20x).

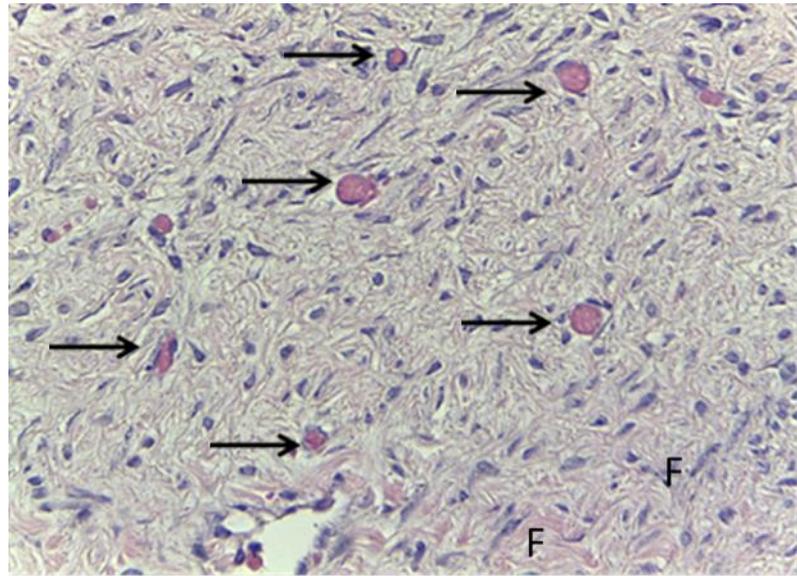


Figura 12. Corte histológico de piel de conejo 1A con PRFC, a los 15 días post quirúrgicos, se evidencian focos de células endoteliales y sangre conformando capilares (flechas), fibroblastos (F) (Microfotografía 40x)

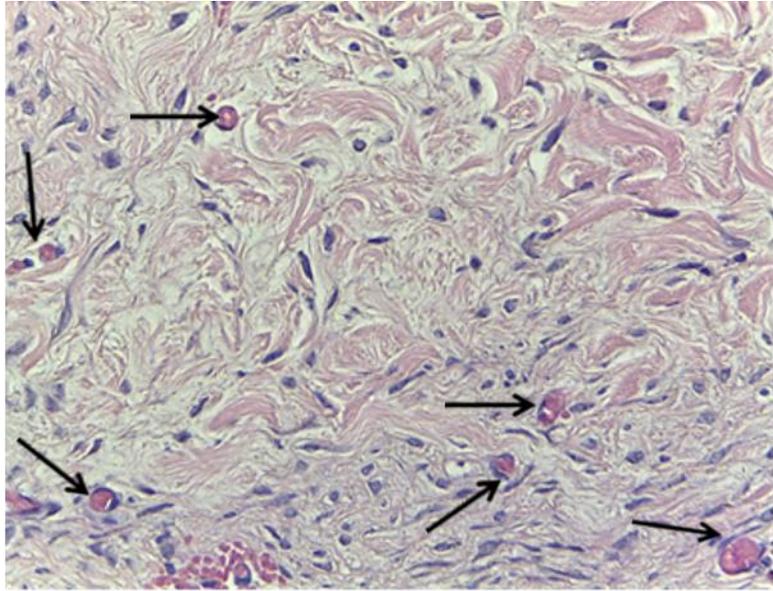


Figura 13. Corte histológico de piel de conejo 1A con PRFC, a los 15 días post quirúrgicos. Se observa neovascularización (flechas) (Microfotografía 40x).

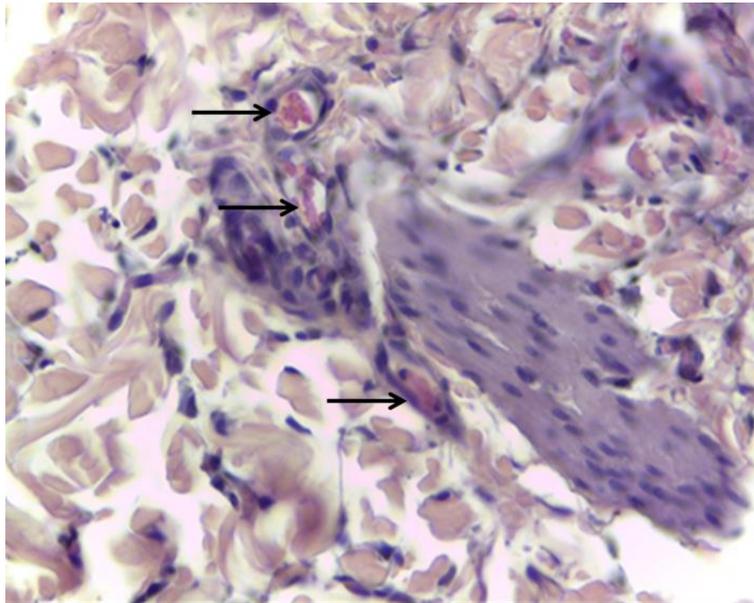


Figura 14. Corte histológico de piel de conejo control a los 30 días de cicatrización, se observan vasos de gran calibre con hematíes en su interior (flechas) (Microfotografía 40x).

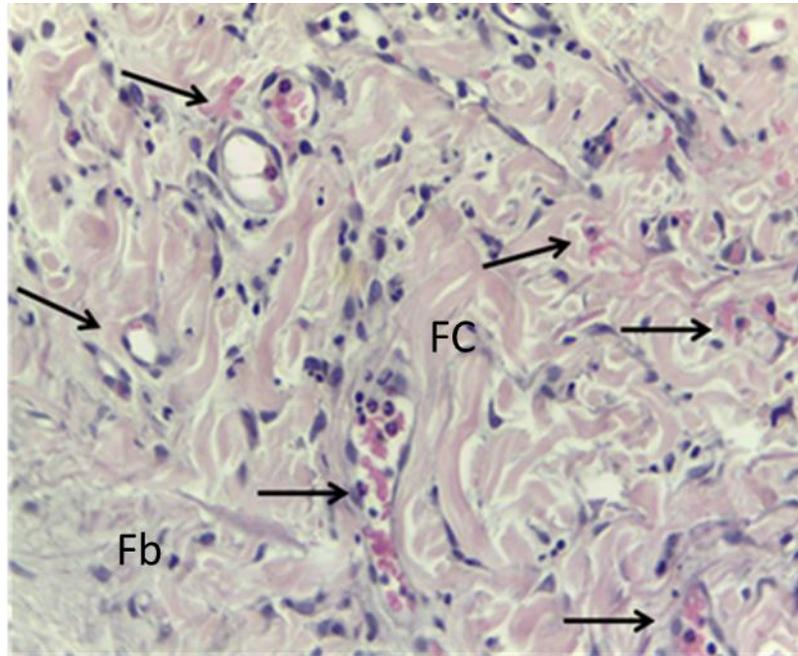


Figura 15. Corte histológico de piel de conejo 1 tratado con PRFC a los 30 días de evolución, se ve mucha irrigación de la dermis (flechas), fibras colágenas (FC), fibroblastos (Fb) (Microfotografía 40x).

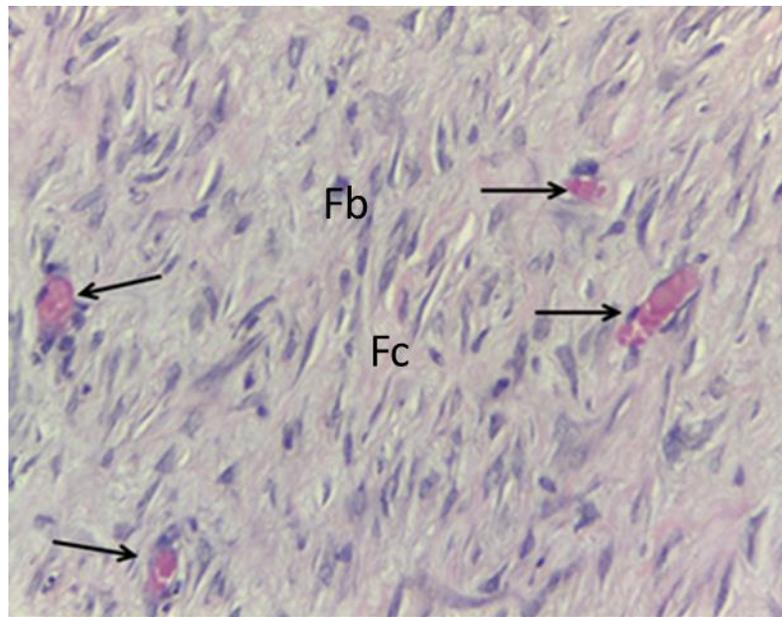
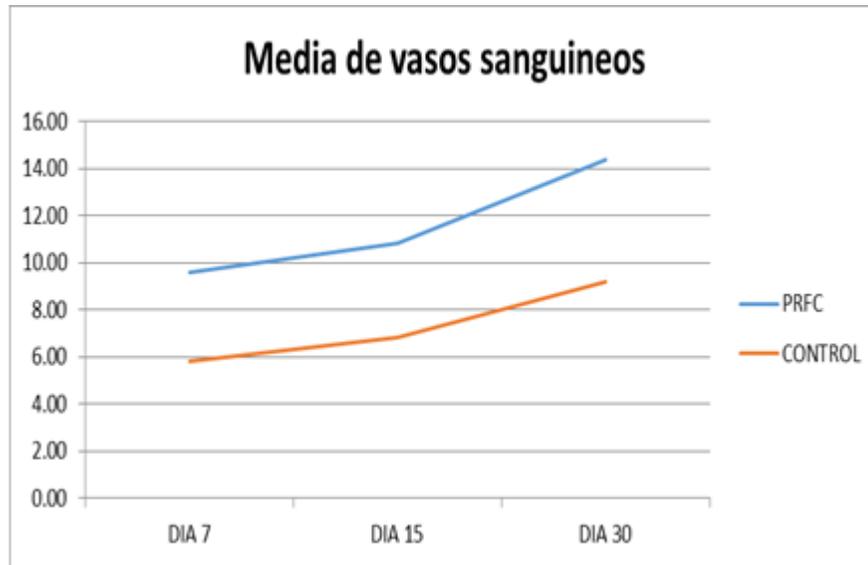


Figura 16. Corte histológico de piel de conejo 1A tratado con PRFC al mes postratamiento. Se observan abundantes fibroblastos (Fb), fibrocitos (Fc) y vasos sanguíneos (flechas). (Microfotografía 40x).

Los valores medios obtenidos para los vasos sanguíneos cuando se empleó PRFC en los colgajos cutáneos demostró valores significativamente mayores ($p < 0.05$) que los controles durante todos los días del estudio.



7 días	PRFC	C	15 días	PRFC	C	30 días	PRFC	C
Promedio	9.60	5.80	Promedio	10.80	6.80	Promedio	14.40	9.20
D S	0.49	0.75	D S	1.60	1.17	D S	3.38	2.64
Prueba T	0.0001		Prueba T	0.0045		Prueba T	0.0433	

Figura 17. Resultados de valores promedio de vasos sanguíneos en los colgajos cutáneos en conejos en grupos Control (C) y para tratados con PRFC a los 5, 7 y 15 días posoperatorios. Representación gráfica y numérica.

DISCUSION

En cirugía reconstructiva la complicación más temida por los cirujanos en la cicatrización de un colgajo cutáneo es un área significativa de necrosis, es decir la muerte celular por falta de nutrientes, que causa el fracaso del procedimiento quirúrgico realizado (Slatter, 2006; Lebas *et al.*, 2013).

O'Toole *et al.* (2001) estudió que la isquemia tisular y la necrosis resultante, son fenómenos indeseados que ocurren durante la transferencia de tejido. La pérdida parcial del colgajo es una complicación adversa e impredecible de la reconstrucción quirúrgica.

La necrosis de un colgajo puede producirse por la presencia de infección o agentes tóxicos, sin embargo Slatter (2006) considera que una inadecuada irrigación es la principal causa de necrosis, observación de este estudio en el modelo experimental empleado. Tal como lo describen algunos autores (Pires Camargo *et al.*, 2014) se observó la piel viable de color rosado, caliente y suave al tacto, mientras que la piel necrótica es de color marrón negruzca, fría y gruesa a la manipulación.

Si bien la necrosis de un colgajo puede no ser evidente hasta los 6 días postquirúrgicos y es más probable cuando son muy largos o muy estrechos donde experimentan tensión o excesivo movimiento como lo refería Lebas *et al.* (2013); en este estudio se observó necrosis en los primeros días, ya que se limitó la llegada de irrigación colateral con el modelo experimental empleado de aislamiento con banda plástica.

En un intento de aumentar la viabilidad de colgajos isquémicos, se han empleado tratamientos con FC, como los factores derivados de los fibroblastos, de células endoteliales y del endotelio vascular, los cuales han demostrado una marcada capacidad para mejorar la supervivencia de colgajos induciendo neovascularización (Hom y Assefa, 1992; Ishiguro *et al.*, 1994; Nall *et al.*, 1996; Padavuri y Browne, 1996).

Freymler (2004) determinó que el PRFC tiene las siguientes ventajas: favorece la acción en conjunto de varios FC al mismo tiempo, evita el riesgo de transmisión de enfermedades, incrementa la vascularización tisular a través del fomento de la angiogénesis, suministra un agente hemostático inmediato, biocompatible que es absorbido por el organismo en días, iniciando una regeneración local y la quimiotaxis para varios linajes celulares, lo que se constató con este trabajo.

Los hallazgos de este estudio demostraron que la aplicación de PRFC mejora significativamente el área de viabilidad del colgajo coincidiendo con la evidencia experimental y

clínica que respalda la acción moduladora de los FC en la respuesta cicatrizal de las heridas (Del Fabro *et al.*, 2011).

La intensa vascularización observada en los colgajos de conejos tratados con PRFC demostró la eficacia de los diferentes FC. Anitua *et al.*(2005) determinó experimentalmente que, entre los FC, el VEGF es responsable de la quimiotaxis y proliferación de células endoteliales, así como también de la hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos acelerando de esta manera el proceso de cicatrización del tejido.

La curación avanzada informada después de aplicar PRFC podría ser explicada por una mayor concentración de VEGF en el sitio de la lesión, lo que estimuló la angiogénesis.

Los resultados coincidieron con estudios anteriores que determinaron que la proteína VEGF puede aumentar el flujo sanguíneo en las regiones isquémicas del colgajo al aumentar la angiogénesis por encima del nivel normal y como resultado, la viabilidad del colgajo aumenta notablemente (Kryger *et al.*, 2000).

CONCLUSION

En conclusión, de acuerdo con el modelo evaluado y los valores promedio obtenidos de vasos sanguíneos, el PRFC induce una respuesta satisfactoria en la neovascularización y en consecuencia favorece la viabilidad de colgajos cutáneos en conejos, constituyendo una alternativa terapéutica para promover la regeneración de tejidos en medicina veterinaria debido a la compatibilidad celular que posee al ser plasma extraído del propio paciente, aprovechando de esta manera la propia capacidad regenerativa no resultando tóxico ni inmunorreactivo. Las plaquetas liberan los FC en el mismo lugar de la lesión, aportando la capacidad de regenerar tejidos, remodelar la matriz extracelular y así mejorar y acelerar la posterior recuperación.

BIBLIOGRAFÍA

ANITUA, E. 1999. Plasma rich in growth factors: preliminary results of the use in the preparation of future sites for implants. Plasma Rico en Factores de Crecimiento: resultados preliminares del uso en la preparación de sitios para futuros implantes. *The International Journal of Oral & Maxillofacial* 1999; p: 529- 535.

ANITUA, E. 2001. Expansión de cresta con osteotomías: Estado actual. Utilización de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (P.R.G.F). *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial* 2001; 23:158-164.

ANITUA, E.; I. ANDIA; M. SANCHEZ; J. AZOFRA; Z.M. DEL MAR; F.M. DE LA; P. NURDEN; A.T. NURDEN. 2005. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. Los preparados autólogos ricos en factores de crecimiento promueven la proliferación e inducen la producción de VEGF y HGF por las células tendinosas humanas en cultivo. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005; 23: p: 281.

ANITUA, E.; M. TROYA; G. ORIVE. 2011. Plasma Rich in Growth Factors promote gingival tissue regeneration by stimulating fibroblast proliferation and migration and by blocking transforming growth factor β 1 induced myodifferentiation. El Plasma Rico en Factores de Crecimiento promueve la regeneración del tejido gingival estimulando la proliferación y migración de los fibroblastos y bloqueando el factor de crecimiento transformante β 1 inducida por mioidiferenciación. *Journal of Periodontology*, 1028-1037

BARBEITO, C.G. y P. F. LAUBE. 2005. Los factores de crecimiento Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. *Analecta Vet*, 2005.

BARREIRA MACEDO, F. y C. CARRIQUIRY. 2006. Tratamiento de heridas utilizando presión negativa tópica. *Revista biomedicina*. 2 (2): 122-130.

BAUER, S.M.; R.J. BAUER; O.C. VELAZQUEZ. 2005. Angiogenesis, vasculogenesis and induction of healing in chronic wounds. La angiogénesis, vasculogénesis y la inducción de la cicatrización en heridas crónicas. *Vascular and Endovascular Surgery* 2005; 39(4) 293-306.

BECA, T. G.; S. HERNANDEZ; A. MORANTE; A. BASCONES. 2007. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Avances en periodoncia e implantología*. 19, 1:39-52.

BERTONE, P.A.; L. RITTA; M.C. ROMANINI; V. MAC LOUGHLIN; P. DAURIA; C.M. BOAGLIO; C. MARKS; A. CRISTOFOLINI. 2016. Valoración histológica del efecto cicatrizante del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en piel de Conejos. Estudio preliminar 2016. Revista Argentina de Morfología. 3(3): 15-19

BLAIR, P. y R. FLAUMENHAFT. 2009. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. Gránulos alfa de plaquetas: biología básica y correlaciones clínicas. Blood Reviews Volume 23, Issue 4, July 2009, Pages 177-189.

CHRISTGAU, M.; D. MODER; K.A. HILLER; A. DADA; G. SHMITZ; G. SCHMALTZ. 2006. Growth factors and cytoquines in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. Factores de crecimiento y citoquinas en el concentrado de plaquetas autólogo y su correlación con los resultados de la regeneración periodontal. Journal of clinical periodontology 2006, 33: 837- 845.

CLARK, R.A.F. 1990. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. Matriz de deposición de fibronectina y expresión de receptores de fibronectina en cicatrización de piel normal. Journal of Investigative Dermatology, 94: Suppl:128-134.

COLLINS, T. 2000. Reparación de los tejidos: regeneración celular, fibrosis y curación de las heridas. Patología estructural y funcional. Hill Interamericana VI edición. Mexico.McGraw-. P: 95-120.

DEL FABBRO, M.; M. BORTOLIN; S. TASCHIERI ; W. ROBERTO. 2011. Is platelet concentrate advantageous for the surgical treatment of periodontal diseases? a systematic review and meta-analysis. ¿El concentrado de plaquetas es ventajoso para el tratamiento quirúrgico de las enfermedades periodontales? una revisión sistemática y meta-análisis. Journal of Periodontology, 1100-1111.

DIEGELMANN, R.F. y M.C. EVANS. 2004. Wound healing: an overview of acute fibrotic and delayed healing. Cicatrización de heridas: una visión de fibrosis aguda y cicatrización retardada. Frontiers in Bioscience 2004;9 (1): 283-9.

DOHAN, D.M; J. CHOUKROUN; A. DISS; S.L. DOHAN; A.J.J. DOHAN; J. MOUHYI, 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): A second generation platelet concentrate. Part 3 Leucocyte activation; A new feature for platelet concentrates. PRF una segunda generación de concentrado de plaquetas. Parte 3. Activación de leucocitos: una nueva característica para los

concentrados de plaquetas. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. Editorial Elsevier. Volume 101, Issue 3, 2006, P: 51-55.

EMING, S.A.; T. KRIEG; J.M. DAVIDSON. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Inflamación y reparación de heridas: mecanismos moleculares y celulares*. Journal Investigation Dermatology 2007 127(3): 514-25.

EPPLEY B.L.; J.E. WOODSELL; J. HIGGINS. 2004. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet rich plasma: implications for wound healing. *La cuantificación de plaquetas y el análisis del factor de crecimiento a partir de plasma rico en plaquetas: implicaciones para la cicatrización de heridas*. Plastic and reconstructive. 114 (6): 1502.

ESNAOLA, M.M.1998. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *patología quirúrgica / surgical pathology*. Medicina Oral 2002; 7: 375-90.

FERNANDEZ GONZÁLEZ, T.; L. GÓMEZ ARCOS; A. RÍOS. 1988. Reconstrucciones plásticas en miembros de perro y gato mediante el uso de injertos de piel en forma de red. Centro Médico Veterinario Delicias, Madrid, España. p: 169-179.

FLORES MONTES, I. 2006. Manejo avanzado de heridas. *Revista mexicana de enfermería cardiológica*. 14 (1): 24-28.

FLORES, J.; M. PALOMAR GALLEGO; J. TORRES GARCIA-DENCHE. 2012. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Revista Española de cirugía lingual y maxilofacial*. Vol. 34 P: 8-17.

FOSSUM, T. W. 2000. *Cirugía en pequeños animales*. 3era ed. Editorial Elsevier P 103-104.

FREYMILLER, E.G. 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. Plasma rico en plaquetas: evidencia para apoyar su uso. *Clinical controversies in oral and maxillofacial surgery: part two*. Journal of oral and maxillofacial Surgery. 62:489-496.

GARCÍA ESCOBAR, I. R. 2009. *Evaluación clínica e histológica de heridas que cicatrizan por segunda intención en perros, al tratarlas con chichipin (Hamelia patens Jacq.)*. Tesis de grado. Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad De San Carlos De Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala. p: 7-9.

GROVETTI, G.; G. MARTINELLI; M. ISSI; M. BARONE; B. GUIZZARDI; B. CAMPANATI. 2004. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Gel plaquetario en la*

cicatrización de heridas crónicas en piel. Editorial Elsevier. Transfusion and Apheresis Science, vol. 30, pp. 145-151.

HOM, D.B. y G. ASSEFA. 1992. Effects of endothelial cell growth factor on vascular compromised skin flaps. Efectos del factor de crecimiento de células endoteliales en colgajos de piel comprometidos vascularmente. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery. 1992; 118: 624–628

HUNT, T. K. 1983. Cicatrización e Infección de las Heridas. Teoría y Práctica Quirúrgica. Editorial Manual Moderno, México, Capítulos I, II, IX. P 1-11-107.

ISHIGURO, N.; Y. YABE; T. SHIMIZU; H. IWATA; T. MIURA. 1994. Basic fibroblast growth factor has a beneficial effect on the viability of random skin flaps in rats. El factor de crecimiento fibroblástico tiene un efecto beneficioso sobre la viabilidad de colgajos de piel aleatorios en ratas. Annals of Plastic Surgery. 1994; 32: 356–360

KIRSNER, R. y W. EAGLSTEIN. 1993. El proceso de curación de las heridas. Clínicas Dermatológicas. Ed. Interamericana, Madrid 11:653-662.

KRYGER, Z.; F. ZHANG; T. DOGAN; C. CHENG; W.C. LINEAWEAVER; H.J. BUNCKE. 2000. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. Los efectos de VEGF sobre la supervivencia de un colgajo aleatorio en la rata: examen de varias vías de administración. Journal Plastic Surgery. 2000; 53: 234–239.

LEBAS, D.; T. WIART; C. GROS; P. MODIANO. 2013. Use of a rhomboid flap to repair temporal and frontotemporal cutaneous defects: 11 cases. Uso de un colgajo romboidal para reparar defectos cutáneos temporales y frontotemporales: 11 casos. Annals of plastic surgery. 2013; 140:170-5.

LEIBOVICH, S.J y R. ROSS. 1975. The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. El rol del macrófago en la reparación: un estudio con hidrocortisona y suero anti macrófago. The American journal of pathology 1975. 78:71-100.

LIBERMAN, J. y A. DALUISKI. 2002. The role of growth factors in the repair of bone. El rol de los factores de crecimiento en la reparación del hueso. Journal of bone and joint surgery, jun 2002: 84, 1032- 1044.

LINEAWEAVER, W.C y M.P LEI. 2004. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. Factor de crecimiento del endotelio vascular, retraso quirúrgico y supervivencia del colgajo cutáneo *Annals of plast Surgery* 2004; 239(6): 866-875.

LIU, Y.; A. KALEN; O. RISTO. 2002. Fibroblast proliferation due to exposure to platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound repair regen.* La proliferación fibroblástica debido a la exposición a concentrados plaquetarios in vitro es pH dependiente. P 336-340.

MARX, R.E.; E.R. CARLSON; R.M. EICHSTAEDT; S.R. SCHIMMELE. 1998. Platelet rich plasma: Growth enhancement for bone grafts. Plasma rico en plaquetas: mejora del crecimiento para injertos óseos. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology* 1998; 85(6):638-646.

MATRAS, H. 1982. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. El uso del gel de fibrina en cirugía oral y maxillofacial. *Journal of oral maxillofacial surgery* 1982;40: 617-622

NALL, A.V.; R.E. BROWNLEE; C.P. COLVIN; G. SCHULTZ; D. FEIN; N.J. CASSISI; T. NGUYEN; A. KALRA. 1996. Transforming growth factor beta 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. El factor de crecimiento beta 1 transformador mejora la cicatrización de heridas y la supervivencia de colgajos al azar en ratas normales e irradiadas. *Archieve Otolaryngology Head Neck Surg.* 1996; 122: 171-177

OROZCO L.; R. SOLER; S. QUEROL. 2010. Factores de crecimiento y células madre. Jornada precongreso SETRADE 2010.

O'TOOLE, G.; D. MACKENZIE; M.F. BUCKLEY; R. LINDEMAN; M. POOLE. 2001. A review of therapeutic angiogenesis and consideration of its potential applications to plastic and reconstructive surgery. Una revisión de la angiogénesis terapéutica y la consideración de sus posibles aplicaciones a la cirugía plástica y reconstructiva. *Journal Plastic Surgery.* 2001; 54: 1-7

PADUBIDRI, A. y E. BROWNE. 1996. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. Efecto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sobre la supervivencia de colgajos de piel al azar de patrón axial en ratas. *Annals Plastic Surgery.* 1996; 37: 604-611

PAVLETIC, M. M. 1991. *Anatomy and circulation of the canine skin.* Review *Microsurgery Anatomía y circulación de la piel canina.* Revisión *Microcirugía* 12 (103-112).

PAVLETIC, M. M. 2011. *Atlas de manejo de la herida y cirugía reconstructiva en pequeños animales*. Tercera edición. Argentina. Prefacio IX. P:2- 9- 16-17-19-20- 306.

PIRES CAMARGO, C.; N. FONTANA; A. MARGARIDO; E. GUANDELINI; G. A. BARRUCCI VIEIRA; L. JACOMO; R. GEMPERLI. 2014. Description of a new experimental model skin flap for studying skin viability in rats. Descripción sobre un nuevo modelo experimental de colgajos cutáneos para estudiar la viabilidad de la piel en ratas. Acta quirúrgica brasilera. Vol. 29

RAMIREZ HERNANDEZ, G. A. 2010. Fisiología de la cicatrización cutánea. Revista Facultad de Salud. 2 (2): 69-78.

REED, G. L. 2002. *Platelet secretion*. Editorial Elsevier Science. San Diego. 181-195.

RODRÍGUEZ, A. 2003. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. Aumento del seno maxilar óseo bovino desproteinizado con inserción simultánea de implantes endóseos con plasma rico en plaquetas. Journal of oral and maxillofacial surgery 2003. 61: 157-163.

ROZMAN, P. y Z. BOLTA. 2007. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft tissue injuries. Uso de factores de crecimiento derivados de plaquetas en el tratamiento de lesiones de la piel y el tejido blando. Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica 2007. 16(4):156-165.

SALEM, Z.; P. PÉREZ; L. HENNING; P. UHEREK; O. SCHULTZ; B. BUTTE y F. GONZÁLEZ. 2000. Heridas. Conceptos generales. Cuadernos de cirugía. Vol. XIV. P:90-99.

SANCHEZ, M.; J. AZOFRA; B. AIZPURUA; R. ELORRIAGA; E. ANITUA; I. ANDIA. 2003. Aplicación del plasma autólogo rico en factores de crecimiento en cirugía artroscópica, Cuaderno Artroscopia. Vol. X, fasc. 1. 2003: 12-19.

SLATTER. 2006. *Tratado de cirugía en pequeños animales*. Tercera edición. P 309 – 372.

SOPENA JUNCOSA, J.; J. AMAT SANJUÁN; J. M. CARRILLO POVEDA; M. GARCÍA ROSELLÓ; R. MAZO TORRES; M. L. ORTIZ GÓMEZ; M. RUBIO ZARAGOZA; M. SÁNCHEZ DE LA MUELA; A. WHYTE OROZCO. 2009. Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales. Editorial SERVET. Cap. III p: 62-63.

TRACY, D. L. 2003. Cuidados quirúrgicos de pequeños animales. Editorial Acribia, S.A. Cap. IV p: 266-268.

VEGA, J.A.; O. GARCIA SUAREZ; A. MARTINEZ ALMAGRO. 2000. Cartílago articular y factores de crecimiento. Mapfre medicina. 11: 212-225.