

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EN BUSCA DE LA MEJOR OPCIÓN TERAPÉUTICA PARA
DISMINUIR LA NECROSIS EN COLGAJO CUTÁNEO
RANDOM EN RATAS**

**(Técnica de retardo de colgajo versus células madres derivadas
de tejido adiposo precondicionadas con hipoxia.)**

MIGUEL LUIS OBAID GARCIA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION MORFOLOGIA**

Director de Tesis: Dra. Mariana Rojas Rauco

2015

**FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Miguel Luis Obaíd García

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biomédicas con mención en Morfología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 16 de marzo del 2015.

**Prof. Dra. Mariana Rojas Rauco
Directora de Tesis**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Estefania Flores

Prof. Dr. David Lemus Acuña

Prof. Dr. Wilfredo Calderón

Dedicado a mi madre
Mónica García,
mi Padre Miguel Obaid
y a todos los que me apoyaron.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a la Dra. Mariana Rojas por todo el apoyo, tanto por facilitarme su lugar de trabajo como su interés en el desarrollo de la tesis.

A mis padres Mónica y Miguel quienes siempre han fomentado el perfeccionamiento en los estudios de manera incondicional. Sin ellos no serían posibles los logros que he tenido al momento.

A Romina Riquelme quien me ha acompañado en este largo camino y ha sido fundamental en mi vida personal como en lo profesional. No hubiese sido tan ameno este recorrido si no fuese por su presencia.

A los doctores David Lemus, Estefanía Flores y Wilfredo Calderón, quienes han sabido transmitir su conocimiento y realizar críticas constructivas.

Al Sr. Francisco Cortés quien dejó su legado a numerosas generaciones con sus preparandos histológicos y trabajo en la facultad.

Y al Dr. Bustos, Dr. Enrique Montiel, Heriberto Coloma, Juan Fernández, Dr. Andrés Stevenson, Dr. Felipe Falcón, Jimena Gatica, Irma Orellana y Alondra Donoso, quienes influyeron directa e indirectamente en el resultado final de mi tesis.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCION	10
1.- Colgajos	11
1.1 Clasificación de los colgajos	
1.2 Colgajos cutáneos random	
1.3 Modelos experimentales de colgajo cutáneo random en ratas.	
2.- Métodos utilizados para aumentar la vitalidad del colgajo cutáneo random	20
2.1 Retardo de Colgajo	
2.2 Células madres	
2.3 Células madres derivadas de tejido adiposo adultas	
2.4 Precondicionamiento de las células madres	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMEN

La isquemia y necrosis constituyen uno de los mayores problemas en cirugía reconstructiva, en particular en los colgajos cuyo aporte vascular es deficiente. Se ha investigado distintos métodos adicionales a la acción quirúrgica con el propósito de aumentar la vitalidad del colgajo. Entre estos se encuentran la administración de células madre mesenquimales de tejido adiposo (ASCs), de médula ósea (BM- MSCs), células madre mesenquimales precondicionadas, retardo del colgajo (RTC), tratamiento farmacológico, terapia genética, entre otros. El objetivo de este estudio, es evaluar la mejor opción terapéutica para disminuir la necrosis en un colgajo cutáneo random en ratas que está predispuesto a necrosis en su porción distal. Para ello se utilizaron 40 ratas macho adultas sometidas a colgajo cutáneo random en el área dorsal de 1:4 (2x8cm) fueron randomizadas en cuatro grupos de 10 animales: grupo 1 control, grupo 2 de retardo del colgajo de 5 días, grupo 3 intervenido con ASCs en condiciones de normoxia (21% O₂ y 5% CO₂) y grupo 4 intervenido con ASCs precondicionadas con hipoxia (ASCs-H) durante 72 horas previa a su administración (2% O₂ y 5% CO₂). Los cultivos de células madre fueron analizados mediante microscopio invertido e inmunofluorescencia con los anticuerpos vimentina y CD90(Thy-1) y se realizaron estudios comparativos de proliferación y de migración celular entre las ASCs y ASCs-H. Al séptimo día post operatorio se realizó eutanasia y se fijaron las muestras en Duboscq Brasil para ser procesadas con técnicas histológicas de hematoxilina- eosina, histoquímicas (Tricómico y Picro-Sirius) e inmunohistoquímica VEGF. La cuantificación de colágeno tipo I y III, visualizadas con técnica de Picro-Sirius con luz polarizada, se realizó con el software Image-Pro® Plus Version 6.0. Por último se realizó cálculo del área de necrosis y se confeccionó una clasificación de necrosis del colgajo cutáneo del cual deriva un score según los hallazgos macroscópicos e histopatológicos. Se consideró significancia estadística $p < 0,05$. En el grupo control se obtuvo un porcentaje de necrosis en promedio de 45,63% +/- 18,27, en el grupo RTC 32,72% +/- 24,75, ASCs 28,73% +/- 16,31 ($p = 0,04$) y ASCs-H 27,99% +/- 10,08 ($P=0,01$). Se obtuvo un score de necrosis en el grupo control de 96,5 +/-

56,93, grupo retardo de colgajo 47,39 +/- 43,88 ($p < 0,05$), grupo ASCs 57,92 +/- 34,66 y grupo ASCs-H con un score total de 58,34 +/- 23,86. En conclusión, la exposición a hipoxia de las células madres aumenta la proliferación y migración celular en forma significativa. La administración subcutánea de ASCs y en mayor medida las ASCs-H disminuye significativamente el área de necrosis respecto al grupo control. En el grupo de retardo de colgajo a pesar de no mostrar diferencias en la disminución del área de necrosis, el grado de necrosis es menor al séptimo día (según clasificación), observándose en algunos casos mayor capacidad de reepitelización respecto al resto de los grupos. La clasificación de necrosis de colgajo cutáneo random podría ser utilizada por otros autores para estudios futuros. Finalmente no se acepta la hipótesis de este estudio. El tratamiento con ASCs y en mayor medida las ASCs-H, logran disminuir significativamente el área de necrosis respecto al control, pero sin diferencia estadística entre ellas, sin embargo al considerar el tipo de necrosis según la clasificación, el grupo de RTC presenta un menor score y por lo tanto necrosis de menor grado respecto al resto de los grupos tratados.

ABSTRACT

Ischemia and necrosis are one of the biggest problems in reconstructive surgery, especially in the flaps when the blood supply is deficient. Various methods have been investigated in order to increase the vitality of the flap. These include the administration of mesenchymal stem cells from adipose tissue (ASCs), bone marrow (BM-MSCs), preconditioned mesenchymal stem cells, delay flap (RTC), drug therapy, gene therapy, among others. The objective of this study is to evaluate the best therapeutic option to reduce necrosis in a random skin flap in rats predisposed to necrosis in distal portion. 40 adult male rats' random skin flaps in the dorsal area of 1: 4 (2x8cm) were used and will be randomized into four groups of 10 animals: group 1 control group, 2 flap delay of 5 days, Group 3 administration of ASCs in normoxia (21% O₂ and 5% CO₂) and Group 4 ASCs management preconditioned with hypoxia (ASCs-H) for 72 hours prior to administration (2% O₂ and 5% CO₂). Stem cell cultures were analyzed with an inverted microscope and immunofluorescence with antibodies anti-vimentin and anti-CD90 (Thy-1), and comparative studies of proliferation and cell migration were performed between ASCs and ASCs-H. On the seventh postoperative day the rats are euthanized and samples fixed in Duboscq Brazil were processed by histological techniques hematoxylin-eosin, histochemical (Masson and Picro-Sirius) and immunohistochemistry VEGF. Finally necrosis area calculation was performed and a classification of skin flap necrosis which derived a score according to macroscopic and histopathological findings were constructed. Statistical significance $p < 0,05$ was considered. In the control group a percentage of necrosis was obtained on average 45.63% + - 18.27, in the RTC group 24.75% +/- 32.72, ASCs 28.73% +/- 16.31 ($p = 0,04$) and ASCs-H 27.99% +/- 10.08 ($P = 0,01$). A score of necrosis in the control group 96.5 +/- 56.93, group delay flap 47.39 +/- 43.88 ($p < 0,05$), ASCs group 57.92 +/- 34, 66 and ASCs-H group with a total score of 58.34 +/- 23.86.

In conclusion, exposure to hypoxia significantly increased stem cell proliferation and cell migration. Subcutaneous administration of ASCs and further the ASCs-H significantly reduced the area of necrosis compared to the control group.

While the group delay flap despite not show differences in decrease of the area of necrosis, the degree of necrosis is lower on the seventh day (according to the classification), observed in some cases greater reepithelialization capacity compared to the other groups. The classification of random skin flap necrosis could be used by other authors for future studies. The hypothesis of this study is rejected. Treatment with ASCs and further the ASCs-H, reduce significantly the area of necrosis compared to the control, but no statistical difference between them, however when considering the type of necrosis by classification, the RTC group has a lower score and therefore lesser extent necrosis compared to other treatment groups.

INTRODUCCIÓN

Habitualmente en cirugía reconstructiva, los defectos cutáneos que no logran resolverse mediante cierre primario, pueden manejarse mediante colgajos locales. Estos se componen de piel y tejido subcutáneo que se transfiere de un lugar a otro manteniendo un pedículo que nutre y preserva el suplemento vascular (Honrado et al., 2005). Se han empleado diversos diseños para cubrir el defecto de la manera más apropiada posible. Así es como los colgajos se han utilizado para cubrir heridas crónicas, tales como úlceras por presión, cobertura de elementos nobles como hueso, tendón, articulaciones, muchas veces expuestos como consecuencia a trauma de alta energía (fracturas expuestas), reconstrucción oncológica, cobertura de elementos protésicos (Andrades et al., 2005) y cierre de defectos en el área cráneo facial, en donde es posible la transferencia de tejidos del mismo color, textura, grosor, sensibilidad similar y con preservación de la línea de implantación de pelo original (Sorolla et al., 2014).

La realización de colgajos cutáneos locales con vascularización random o aleatoria, es un procedimiento muy común y conveniente usado en cirugía. Pero la necrosis parcial o completa del colgajo, sigue siendo una de las principales complicaciones (Chung et al., 2013). Es por ello que se han realizado numerosos estudios hasta el momento, buscando diferentes formas y procedimientos con el fin de disminuir el área de necrosis.

Hasta el momento no existe literatura que muestre la superioridad de los distintos métodos utilizados como son las células madres y retardo de colgajo para aumentar la supervivencia en colgajo cutáneo random en ratas.

El propósito de este estudio es comparar la efectividad de estos métodos en el aumento de la supervivencia del colgajo predispuesto a necrosis en su zona distal, y evaluar si el acondicionamiento de las ASCs por medio de hipoxia, es superior a la utilización de ASCs no acondicionadas y retardo del colgajo en comparación con el grupo control.

1.- Colgajos

1.1 Clasificación de los colgajos

Para comprender los factores que están involucrados en la supervivencia de un colgajo, hay que conocer su clasificación.

Al inicio de la introducción definimos lo que es un colgajo, este implica el transporte de tejido desde un área dadora hasta un área receptora, manteniendo su conexión vascular con el sitio de origen. Como excepción en el colgajo libre, el nexo vascular es interrumpido, pero luego restituido con técnicas microquirúrgicas en el área receptora (Andrades et al., 2005).

Los colgajos se pueden clasificar según su localización, composición y vascularización.

Según la localización: colgajos locales, a distancia y libres.

Los colgajos locales constituyen la mayoría y utilizan el tejido adyacente al área de defecto para lograr la cobertura de ésta, a diferencia de los colgajos a distancia en el cual se utiliza tejido de áreas corporales alejadas del área de defecto a cubrir (manteniendo su conexión vascular), para luego en un segundo tiempo quirúrgico liberarse, a modo de ejemplo, se puede utilizar un colgajo torácico a distancia para la reconstrucción de un segmento de la mano en un caso de desforramiento de la cara dorsal (Santander et al., 2007). Y por último el colgajo libre ya descrito previamente.

Según su composición: simples o compuestos.

Simple: cutáneo (piel y tejido celular subcutáneo), fascial, muscular.

Compuesto: Cutáneofascial, musculocutáneo y osteomiocutáneo (Patel et al., 2011).

Según la vascularización: axial o arterial y random o aleatoria.

El aporte vascular es el factor más importante y determinante para la supervivencia de un colgajo. Y se entiende por tanto que una de las complicaciones

quirúrgicas más frecuentes en el área de cirugía plástica se debe a problemas circulatorios.

El concepto de vascularización axial y random se logra entender luego de conocer la anatomía. A nivel de la dermis se encuentran, el plexo vascular superficial o subpapilar que se ubica entre la capa reticular y papilar de la dermis, y el plexo vascular profundo se encuentra entre la dermis reticular y el tejido celular subcutáneo (Sorrell et al., 2004), seguido por el plexo subdérmico a nivel de la hipodermis. La piel a su vez recibe aporte vascular a través de una arteria cutánea directa que proviene de las ramas perforantes musculocutáneas o septocutáneas, que derivan de las arterias segmentarias que se encuentran por debajo de las masas musculares acompañadas con sus venas y nervios periféricos. Los colgajos con vascularización random, reciben aporte vascular de los plexos y no de una arteria cutánea identificable (Patel et al., 2011). La mayoría de los colgajos locales cutáneos se encuentran en esta categoría. Por otra parte, el patrón de supervivencia de un colgajo axial, va a estar determinada por el largo de la arteria principal que lo irriga combinado con la vascularización random a través del plexo dermal y subdérmico (Kayser, 1999), mientras que el área más distal del colgajo, solo presenta irrigación random.

Se puede concluir por tanto, que los colgajos axiales permiten una extensión mayor del mismo, en contraposición con los colgajos con aporte aleatorio.

1.2 Colgajos cutáneos random

Los colgajos cutáneos random son ampliamente utilizados en cirugía plástica y reconstructiva, presentan la ventaja de no tener que identificar una arteria principal puesto que su vitalidad está determinada por los plexos y por ende, la complejidad quirúrgica es menor. Su desventaja radica principalmente en que sólo permite obtener una extensión máxima de 2:1, la cual es la proporción que permite que el tejido tolera sin evolucionar a la isquemia y necrosis (Giunta et al., 2005; McGregor et al., 1973). Esta descripción puede ser de ayuda para realizar el diseño de un colgajo con vascularización aleatoria, pero no necesariamente un pedículo más ancho, va a aumentar el área de vitalidad del colgajo. Esto se explica por una segunda variable que corresponde a la presión de perfusión. Existe una caída progresiva de la presión a medida que aumenta la distancia desde la base del colgajo. Si esta distancia es muy extensa y la caída de la presión es muy pronunciada, llega hasta un punto de no retorno, el cual implica la oclusión de las arteriolas a nivel del plexo subdérmico y la necrosis del tejido subsecuentemente (Baker, 1995). Una caída del índice de presión por debajo del 25%, podría predecir necrosis (Giunta et al., 2005). Por lo tanto, un colgajo puede presentar mayor área de vitalidad que otro con las mismas dimensiones de largo y ancho por presentar presiones de perfusión distintas.

Existen múltiples cambios fisiopatológicos al momento de elevar un colgajo random que van a determinar su viabilidad y resultado final.

Ocurre una interrupción parcial del aporte vascular con una disminución importante de la presión de perfusión a medida que se aleja de la base. Esto habitualmente no ocurre cuando el aporte vascular es axial, en los colgajos con una arteria musculocutánea o septocutánea.

Se seccionan nervios cutáneos y simpáticos, con liberación de factores neurovasoconstrictores desde los terminales nerviosos, provocando un estado hiperadrenérgico local y vasoconstricción disminuyendo aún más el flujo sanguíneo. Esta fase dura entre 6 a 12 horas aproximadamente, y dura hasta que la perfusión

vuelve a restaurarse al segundo o tercer día. Esta injuria isquémica además está influenciada por el daño endotelial mediado por los leucocitos que conduce a inflamación, agregación plaquetaria y oclusión de las arteriolas (Nezami et al., 2011; Taleb et al., 2014).

Una vez depletadas las catecolaminas liberadas desde los terminales nerviosos se produce un aumento del flujo sanguíneo, el cual es el condicionante de la producción de radicales libres al estar nuevamente presente el oxígeno por el fenómeno isquemia/reperfusión. La recuperación del flujo sanguíneo hacia los tejidos isquémicos puede fomentar la recuperación de las células con lesiones reversibles. Sin embargo, cuando se recupera el flujo hacia células que han experimentado daño por la isquemia, se produce una exacerbación paradójica de la lesión (Robbins 2010) contribuyendo aún más a la generación de necrosis del tejido postisquémico (Baker, 1995). Entre los mecanismos involucrados se encuentra un aumento de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en las células del tejido, del endotelio y los leucocitos que infiltran la zona. La entrada masiva de calcio a las células, causa daños en los organoides, mitocondrias, que contribuyen a la producción de radicales libres. Los leucocitos circulantes son atraídos hacia el tejido reperfundido y activan el sistema del complemento (Robbins 2010) que contribuye a amplificar el daño de manera directa, por formación del complejo de ataque de membrana, e indirecta, estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias y la migración y adhesión de leucocitos (Romanque et al., 2005). En el tejido necrótico de la zona distal del colgajo, se puede encontrar un aumento en la actividad de las enzimas mieloperoxidasa (MPO), (Kosko et al., 1997), xantina oxidasa (XO) y xantina deshidrogenasa (XDH) que se correlacionan con un aumento en la concentración de neutrófilos en esta área (Rees et al., 1994). Los neutrófilos contienen 4 formas de MPO, el incremento de la actividad de la MPO se ha descrito en distintos procesos patológicos y está relacionado directamente con el estrés oxidativo en procesos de isquemia / reperfusión (García et al., 1998). Durante el período isquémico el ATP es catabolizada a hipoxantina. El estrés hipóxico promueve la conversión de la enzima xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, luego cuando ocurre la reperfusión el oxígeno molecular es reintroducido al tejido el

cual reacciona con la hipoxantina y la xantina oxidasa para dar lugar a la formación del anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las que reaccionan con el hierro favoreciendo la producción del radical hidroxilo (OH). Esta especie reactiva citotóxica inicia la peroxidación lipídica de las membranas celulares determinando una pérdida del equilibrio osmótico con entrada de líquidos e iones a la célula y pérdida del contenido celular (Robbins, 2010) y también promueve la adherencia de granulocitos al endotelio provocando daño de la microvasculatura (Granger, 1988).

La realización del proceso quirúrgico genera un estado inflamatorio local con liberación hacia el medio extracelular de quininas, histaminas y serotoninas, responsables del aumento de la permeabilidad microvascular y aumento de la concentración proteica a nivel extravascular y la subsecuente generación de edema, el cual podría ser perjudicial en una etapa precoz (Baker, 1995). Posteriormente en una fase más tardía se formarían las prostaglandinas (que forman parte de los eicosanoides), a partir del ácido araquidónico liberado de las membranas plasmáticas de las células dañadas. El ácido araquidónico junto con la acción de las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX 1) y ciclooxigenasa 2 (COX 2), forman la PGG₂ y la PGH₂. De éstas derivan la formación de las distintas prostaglandinas a través de la prostaglandina isomerasa (PGE₂, PGE₁, (Iyú et al. 2011) PGD₂, PGF₂), prostaciclina (PGI₂) (por medio de la enzima prostaciclina sintetasa) y tromboxanos TxA₂ (por medio de la enzima tromboxano sintetasa) esta última presenta una degradación no enzimática dando lugar al tromboxano TxB₂ (Folco & Murphy, 2006; Ricciotti et al., 2011).

La PGE₂ es una de las prostaglandinas que se encuentran en mayor cantidad en el organismo y produce vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y dolor a través de la acción sobre los terminales nerviosos periféricos sensitivos, por lo tanto responsable de los signos clásicos de inflamación (edema, eritema y dolor) (Funk, 2001; Ricciotti et al., 2011). Es sintetizada en el citoplasma de varios tipos celulares. La prostaciclina PGI₂ constitutivamente es expresada en el endotelio vascular, otras fuentes son las células musculares lisas de la pared vascular (VSMCs) y las células endoteliales progenitoras (EPGs) (Kawabe et al., 2010;

Ricciotti et al., 2011), es un vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria, promotor de la adhesión leucocitaria y proliferación de las VSMC. Es un importante mediador del edema y dolor que acompaña a la inflamación (Noda et al., 2007; Ricciotti et al., 2011). La PGE1 es una prostaglandina que produce vasodilatación de los vasos periféricos e inhibe la agregación plaquetaria, similar a lo realizado por la PGI2 (Suzuki et al., 1987). La PGD2 producida en los mastocitos tiene efecto similar a la PGE2. La PGF2 induce vasoconstricción (Murphy et al., 1985). Los tromboxanos expresados principalmente en plaquetas y también en macrófagos, tienen efecto contrario a la mayoría de las prostaglandinas, el TxA2 promueve la vasoconstricción, agregación plaquetaria, contracción y proliferación de las células musculares lisas, y activación de una respuesta inflamatoria endotelial (Félétou et al., 2010). Este podría tener un rol importante en el estrés oxidativo (Ricciotti et al., 2011).

Por último, la endotelina 1 (ET-1) es el péptido endógeno vasoactivo endotelial más potente conocido en la actualidad y es secretado mayormente por las células endoteliales (Agapitov & Haynes, 2002). Es el causante de una vasoconstricción importante, promueve un estado pro inflamatorio, estimula la formación de radicales libres y agregación plaquetaria (Böhm & Pernow, 2007). Este péptido puede jugar un rol importante en la generación de necrosis en el colgajo cutáneo random en su porción distal. Es un potente inductor de la contracción arteriolar terminal. Luego de 6 horas de la elevación del colgajo, se puede encontrar un aumento significativo de su concentración en la porción distal del colgajo random en comparación con la parte proximal (Mobley et al., 2003).

Por lo tanto, la vitalidad del colgajo va a depender de la severidad de la isquemia, del estrés oxidativo durante el período de reperfusión, de los niveles de expresión de los distintos mediadores de la inflamación y de sustancias vasoactivas y de la tolerancia celular de evitar un daño celular irreversible, resultando en necrosis del colgajo subsecuentemente (Figura 1).

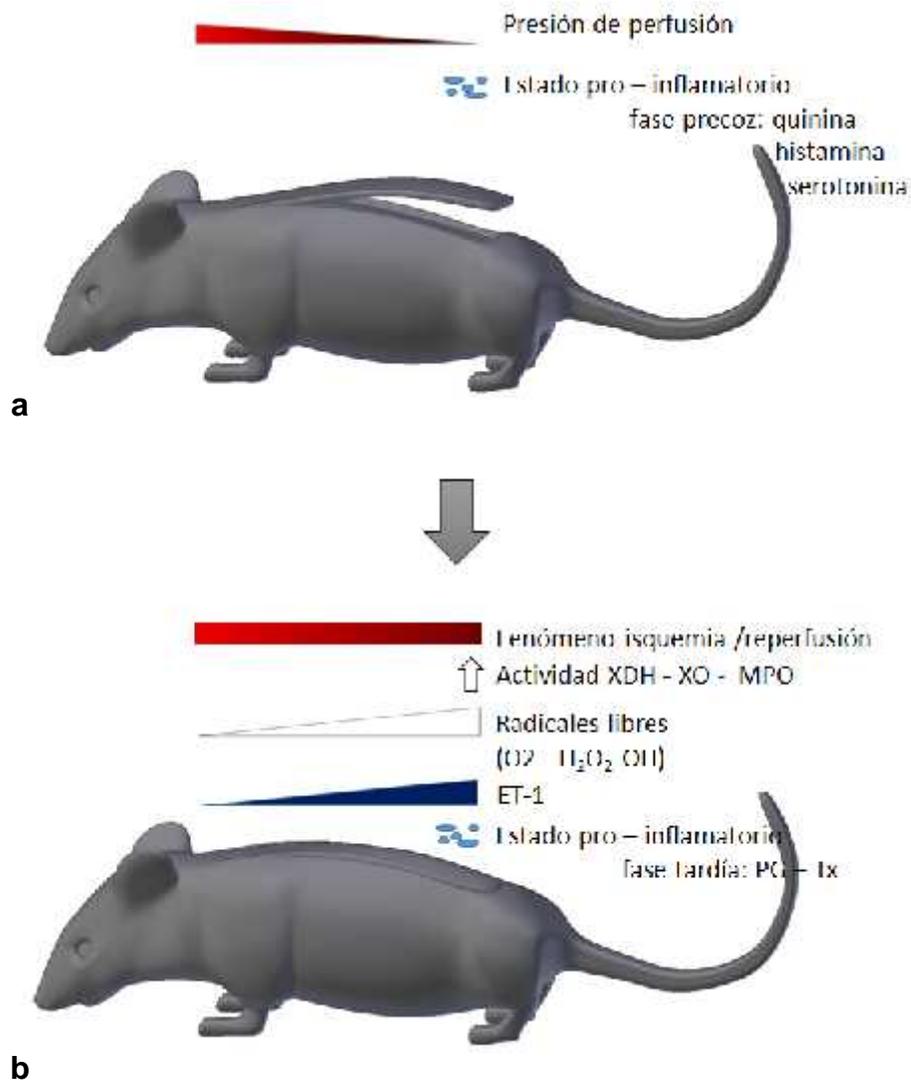


Figura 1:

En la figura (a) se observa como disminuye la presión de perfusión al levantar el colgajo a medida que aumenta la distancia respecto a la base. Esto por los cambios ocurridos por la interrupción parcial de la irrigación vascular y acentuada por la vasoconstricción mediada por las catecolaminas liberadas. Por otra parte se produce una respuesta inflamatoria primaria por liberación de quinina, histamina y serotonina. En la figura (b), muestra un segundo mecanismo de injuria mediado por el fenómeno de isquemia / reperfusión, estrés oxidativo con liberación de radicales libres y aumento de concentración de ET-1 en la porción distal del colgajo random, favoreciendo la vasoconstricción e isquemia. En esta fase se puede encontrar un aumento de la concentración tanto de las prostaglandinas como de los tromboxanos.

XDH: xantina deshidrogenasa, XO: xantina oxidasa, MPO: mieloperoxidasa, O₂⁻: anión superóxido, H₂O₂: peróxido de hidrogeno, OH: radical hidroxilo, ET-1: endotelina 1, PG: prostaglandina, Tx: tromboxano.

Todos estos mediadores liberados juegan un rol importante en la fisiopatología del colgajo random, su conocimiento es crucial para el desarrollo de distintas opciones terapéuticas. Cada uno de estos factores es posible de modificar farmacológicamente, quirúrgicamente o mediante la aplicación de células madres. Un gran esfuerzo y numerosas publicaciones se han desarrollado en este ámbito hasta el momento con el fin de prevenir el desarrollo de necrosis del colgajo.

1.3 Modelos experimentales de colgajo cutáneo random en ratas.

Debido a la existencia de múltiples variables y factores que influyen en la supervivencia de un colgajo random, se han diseñado diversos modelos experimentales en animales con el fin de obtener un modelo útil de estudio. En 1965 McFarlane describió un modelo de colgajo dorsal que evolucionaba a necrosis parcial del colgajo (McFarlane et al., 1965). Inicialmente este diseño se catalogó como un modelo reproducible, conveniente y de bajo costo para el estudio de la fisiología del colgajo (Adamson et al., 1967), ampliamente utilizado por varios autores hasta presentar inconsistencia de los resultados.

Posteriormente Hammond et al., 1993, concluyó que el área distal del colgajo dorsal en rata, podía mantener su vitalidad al actuar como injerto si mantenía contacto directo con el lecho. Por lo que sugirió que este factor se podría controlar separando el colgajo del lecho mediante una lámina plástica, o levantado el colgajo cubriendo completamente con piel la zona del lecho mediante cierre primario, y luego reposicionar el colgajo en su posición anatómica. De esta manera el colgajo quedaría completamente aislado sin influencia del lecho (Hammond et al., 1993).

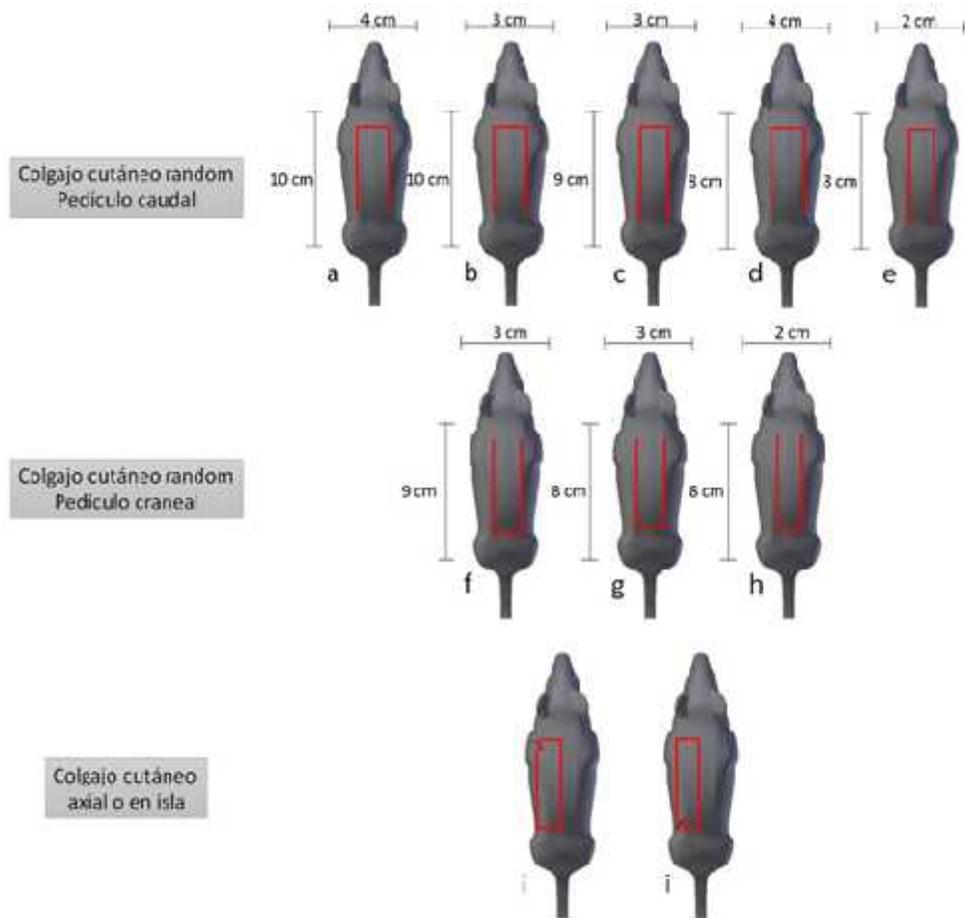


Figura 2:

- a.- Diseño descrito por McFarlane de colgajo cutáneo random de ratona por dorsal, para el estudio de la necrosis y su prevención. Este se extiende 2cm a ambos lados de la línea media manteniendo su pedículo a nivel de las caderas y se extiende hasta la cintura escapular (McFarlane et al., 1965).
- b.- Modificación por Khouri del colgajo diseñado por Mc Farlane. Se extiende 1.5 cm a ambos lados de la línea media manteniendo su pedículo a nivel caudal (Mobley et al., 2003).
- c.- Modificación del diseño original descrito por McFarlane por Khouri, se extiende 1.5cm a ambos lados de la línea media, manteniendo su pedículo a nivel de la cresta ilíaca, extendiéndose hacia craneal (Kelly et al., 2010).
- d.- Modificación del colgajo cutáneo dorsal descrito por McFarlane, rectangular de 4 x 8 cm a nivel de línea media, con margen distal a nivel de cintura escapular (Bagdas et al., 2014).
- e.- Colgajo cutáneo dorsal de 2 x 8 cm a nivel de línea media, pedículo a nivel de las caderas. (Rahimpour et al., 2014; Kiumehr et al., 2005).
- f.- Colgajo cutáneo dorsal de 3 x 9 cm elevándose a nivel de línea media manteniendo pedículo craneal (Yang et al., 2010).
- g.- Colgajo cutáneo dorsal de 3 x 8 cm elevándose a nivel de línea media manteniendo pedículo craneal (Estevão et al., 2013).
- h.- Colgajo cutáneo dorsal de 2 x 8cm elevándose a nivel de línea media manteniendo pedículo craneal (da Rocha et al., 2010; Wang et al., 2011).
- i.- Colgajo en isla que se extiende 3 cm aproximado de la línea media hacia lateral, con base craneal se identifica la arteria torácica lateral (Tatlidede et al., 2009). Se aísla y se eleva el colgajo manteniendo solamente la conexión vascular. Luego se reposiciona y se sutura en la misma zona.
- j.- Colgajo en isla que se extiende 3 cm aproximado de la línea media hacia lateral con base caudal se identifica arteria circunfleja iliaca profunda (Ohara et al., 2008). Se aísla y se eleva el colgajo manteniendo solamente la conexión vascular. Luego se reposiciona y se sutura en la misma zona.

Se han realizado múltiples diseños de colgajos luego del descrito por McFarlane tanto en la zona dorsal como ventral, de distintas dimensiones, manteniendo su pedículo craneal o caudal. En la Figura 2 se ilustra la mayoría de los diseños de colgajos cutáneo random en la zona dorsal. Estos deben elevarse de la línea media y deben incluir piel, tejido celular subcutáneo y musculatura estriada que se inserta a nivel de la dermis reticular también llamado panículo carnososo. Para que sea considerado colgajo random no debe presentar en el pedículo un vaso nutricio directo proveniente de la arteria iliolumbar si la conexión vascular está hacia caudal (Rahimpour et al., 2012) o de la arteria torácica lateral si su base se encuentra a nivel craneal (Ohara et al., 2008).

Existen también diseños con vascularización axial de la arteria torácica lateral (Tatlidede et al., 2009) o de la arteria circunfleja iliaca profunda (Ohara et al., 2008), estos se diseñan aproximadamente a 3 cm de la línea media, se identifica la arteria y se aísla, luego se levanta completamente el colgajo manteniendo solo su conexión con esta arteria, para luego reposicionarlos en su posición anatómica. Estos colgajos con vascularización axial, también se denominan colgajos en isla.

2.- Métodos utilizados para aumentar la vitalidad del colgajo cutáneo random

A pesar del conocimiento existente sobre la planificación del diseño del colgajo para la optimización del aporte vascular y conservación de éste, aún sigue siendo la isquemia y necrosis uno de los mayores problemas en cirugía plástica y reconstructiva (Barker et al., 1999). Por esta razón se han realizado múltiples estudios con la intención de encontrar una modalidad terapéutica que mejore la supervivencia del colgajo (Figura 3).

Siguiendo los mismos fundamentos fisiopatológicos descritos anteriormente, se han evaluado distintos agentes farmacológicos con la finalidad de prevenir o reducir la isquemia del colgajo, aumentando el aporte vascular mediante la utilización de simpaticolíticos, vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, disminuyendo la viscosidad sanguínea con anticoagulantes, inhibiendo la

inflamación con inhibidores de las prostaglandinas, anticoagulantes, secuestro de radicales libres con alopurinol (Mobley et al., 2003), aumentando el oxígeno tisular con oxígeno hiperbárico y administración de agentes pro angiogénicos como el VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (Kryger et al., 2000), entre otras citoquinas: (FGFb: factor de crecimiento para fibroblástico básico, TGF-B: factor de crecimiento transformante beta (Gurunluoglu R. 2005), Ang-1: angiopoyetina 1 (Jung et al., 2003), PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas y ECGF: factor de crecimiento de células endoteliales) (Zhang et al., 2002).

Se han realizado procedimientos quirúrgicos para someter al colgajo a una isquemia parcial antes de su elevación y transferencia durante una segunda intervención quirúrgica con la finalidad de aumentar su vitalidad. Esta técnica se conoce como retardo de colgajo.

También se han desarrollado terapias genéticas a través de un vector adenoviral. Este procedimiento proporciona un vector de expresión de adenovirus recombinante caracterizado por una delección total del ADN adenovírico y que tiene un gen que codifica una proteína o factor de interés del investigador o clínico. Tiene la ventaja y la habilidad de infectar las células huésped, es bien tolerado manteniendo una viabilidad celular cercana al 100%, y no se integra a nivel cromosomal, por lo tanto no hay riesgo de inactivar genes o activar oncogenes. Una vez que infecta a las células comienza a expresar el factor en particular por un tiempo prolongado. Se describe un peak de expresión del factor al quinto día post administración del vector adenoviral. Esta característica resulta beneficiosa especialmente para agentes que necesitan altas dosis y aplicaciones diarias para lograr el efecto deseado (Gurunluoglu R. 2005). Su desventaja radica en el alto costo asociado.

El retardo de colgajo viene siendo uno de los procedimientos más ampliamente utilizados en cirugía plástica y reconstructiva y con más evidencia sobre sus beneficios y su superioridad respecto a variadas opciones farmacológicas (Barker et al., 1999; Lopez et al., 1995; Kubulus et al., 2004). Con menos evidencia

y aún controversial es el tiempo necesario de espera desde la primera intervención quirúrgica a la elevación del colgajo.

Por último se encuentra el tratamiento con células madres. Estas se caracterizan por su habilidad de auto-renovación y diferenciación en múltiples linajes celulares (Rebelatto et al., 2008). Existen distintas fuentes de obtención, últimamente la más atractiva tanto por su accesibilidad como por preservar sus características propias son las células madres derivado de tejido adiposo adultas (ASCs). En la práctica clínica resultaría ventajoso recolectar ASCs a través de lipoaspirado e inmediatamente administrarlas en el mismo paciente en la zona de interés (Jurgens et al., 2008). Estas además recientemente se han podido potenciar mediante un acondicionamiento con hipoxia. La exposición a hipoxia a un nivel no letal, aumenta significativamente la tolerancia celular y presenta una mejora en las propiedades regenerativas de las células madres. A través de características de mejoramiento en la supervivencia, en los efectos paracrinos con una obtención de un mejor soporte trófico, mejor tolerancia en el sitio de lesión luego de ser administradas, aumento de la proliferación y capacidad de migración a regiones isquémicas o alrededor de un tejido infartado (Yu et al., 2013).

El tratamiento con células madres ha resultado promisorio y llama la atención un efecto potencial global. A diferencia de los métodos farmacológicos que actúan frente a un factor en específico (angiogénesis, vasodilatación, simpaticolíticos, secuestro de radicales libres, inhibición de prostaglandinas, etc), estas células en teoría por su capacidad de diferenciación en múltiples linajes celulares, tendrían una función que abarcaría en forma más global la fisiopatología del colgajo.

Por ello, resultaría interesante comparar el retardo de colgajo, el cual es un procedimiento superior a muchos métodos farmacológicos, con el tratamiento con células madres precondicionadas con hipoxia.

Se describen a continuación en forma más detallada estos últimos métodos.

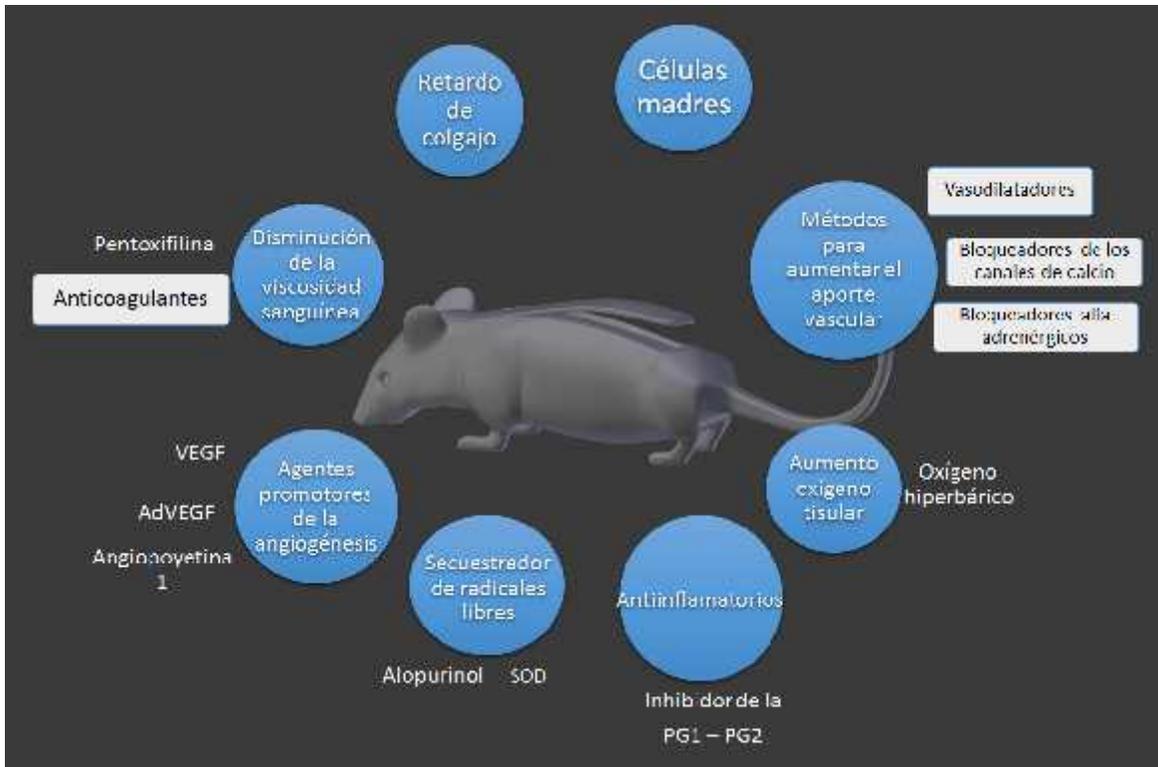


Figura 3:

Se ilustra distintos métodos farmacológicos , quirúrgicos, genéticos y con células madres, para disminuir o prevenir la isquemia y/o necrosis del colgajo. PG: prostaglandina, SOD: superóxido dismutasa (enzima antioxidante), VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial, AdVEGF: adenovirus codificador de VEGF.

2.1 Retardo de Colgajo

Como se describió en forma breve anteriormente, el retardo del colgajo es un procedimiento quirúrgico en que se somete a isquemia en forma parcial al colgajo, para ello se realiza una interrupción vascular en forma quirúrgica en los bordes del colgajo para luego ser suturado en su sitio. Posteriormente se espera un tiempo variable de días para que durante un segundo tiempo quirúrgico este pueda ser elevado y transferido. Este método permite obtener consistentemente un mayor largo del colgajo sin necrosis, en comparación al colgajo que fue elevado y transferido en un primer tiempo (Barker et al., 1999). Los resultados alentadores del retardo de colgajo son bien conocidos, pero los mecanismos involucrados aún son poco claros (Lopez et al., 1995). Varias alternativas farmacológicas se han propuesto y han mostrado variables grados de efectividad en el aumento del área

de sobrevivencia del colgajo, pero ninguna ha superado este método (Barker et al., 1999; Lopez et al., 1995; Kubulus et al., 2004).

Varias hipótesis han tratado de explicar este fenómeno, pero la más aceptada hasta el momento se debería a una mejora en el aporte vascular explicado por un aumento del flujo sanguíneo. Esto ocurriría secundariamente a la formación de nuevos vasos sanguíneos o por una vasodilatación de los vasos preexistentes.

La vasodilatación podría explicarse a consecuencia de la denervación simpática del colgajo. Esto ocurriría en una etapa precoz, pero este mecanismo por sí solo no explicaría todos los beneficios. Luego de esto, la angiogénesis podría contribuir al aumento de la sobrevivencia del colgajo (Lopez et al., 1995).

Estos datos son concordantes con los estudios posteriormente realizados por Holzbach et al., (2009) en el cual muestra el rol del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en el retardo del colgajo, evidenciando un aumento significativo de su expresión al 3er día y un aumento de la perfusión y disminución de la incidencia de necrosis de manera significativa al 5to día. Estos datos se correlacionan con un aumento en el diámetro de los vasos sanguíneos y en la densidad microvascular. El estudio de Lineaweaver et al., (2004) realizado en ratas que fueron intervenidas quirúrgicamente con retardo de colgajo musculocutáneo de recto abdominal transversal (TRAM), también mostró un aumento significativo de los factores bFGF y VEGF, sin cambios significativos en la expresión de mRNA de las citoquinas TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

En relación al tiempo óptimo requerido para el retardo de colgajo, aún no hay datos concluyentes, pero se describe beneficios a partir del segundo (Myers and Cherry, 1967) y tercer día (Lopez et al., 1995). Según el estudio de Holzbach et al., (2009), el quinto día sería el tiempo adecuado ya que se correlacionaría con una disminución del área de necrosis dado por un aumento de expresión de VEGF, pero por otra parte, comúnmente se ha utilizado un intervalo de tiempo que va desde los 7 a 14 días (Lineaweaver et al., 2004). Una de las principales desventajas la realización de un procedimiento quirúrgico adicional.

2.2 Células madres

Las células madres se caracterizan por su habilidad de auto-renovación y diferenciación en múltiples linajes celulares (Rebelatto et al., 2008). Las alternativas de células troncales disponibles son: células troncales embrionarias (Embryonic Stem Cells, ESCs) y células troncales adultas (Meruane y Rojas. 2010). A pesar del gran potencial terapéutico encontrado en las ESCs por su capacidad de auto-renovación y pluripotencialidad, presentan limitaciones en la práctica clínica por consideraciones éticas, manipulación genética y regulación celular (Mizuno. 2009). En contraste, las células madres adultas por naturaleza son inmunocompatibles y no presentan limitaciones éticas para su uso (Mizuno. 2009). De este último grupo se ha identificado que durante el proceso de cicatrización intervienen células indiferenciadas denominadas células madres mesenquimáticas (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) (Meruane y Rojas. 2011). Se ha identificado distintas fuentes, inicialmente se aislaron en la médula ósea (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BM-MSCs) (Friedenstein et al., 1970), luego en el cordón umbilical y últimamente en el tejido adiposo.

2.3 Células madres derivadas de tejido adiposo adultas

Las ASCs tienen la ventaja de encontrarse grandes cantidades en el individuo, poseen una extensa capacidad de auto-renovación, se pueden aislar fácilmente y poseen el potencial de diferenciación en distintas líneas celulares tales como: adipocitos, osteoblastos, condrocitos, neuronas, miocitos en respuesta a distintos factores inductores (Rebelatto et al., 2008).

Estas células se caracterizan por su morfología que recuerdan a los fibroblastos, presentan propiedades adhesivas y de auto-renovación, así como la capacidad de diferenciarse in vitro en tres tejidos mesodérmicos tales como óseo, cartilaginoso y adiposo. Expresan marcadores de superficie CD29, CD44, CD90, CD105 con ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos y HLA-DR (Rebelatto et al., 2008; Kern et al., 2006). Otro marcador es la vimentina, proteína

que se encuentra en los filamentos intermedios de las células mesenquimales (Nikoli et al., 2011; Lama et al., 2007).

Gimble et al. (2007) sugiere que para que las células madres se apliquen en medicina regenerativa, deben cumplir los siguientes criterios:

1. Encontrarse en abundantes cantidades (de millones a billones de células).
2. Obtenerse a través de un procedimiento mínimamente invasivo.
3. Poseer la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares de una manera regulable y reproducible.
4. Trasplantarse en forma segura y efectiva a un huésped autólogo o alógeno.
5. Manipulables de acuerdo a las guías de buena práctica.

La aplicabilidad de las ASCs resulta atractivo por la gran prevalencia de obesidad en el mundo, además por su fácil obtención a través de lipoaspirado que va desde 100ml a >3lt. que rutinariamente es eliminado (Gimble et al., 2007; Katz et al., 1999). Para la obtención de tejido adiposo es preferible la región abdominal en comparación a otras áreas como de la cadera y muslo, por la mayor cantidad en forma significativa de ASCs. Las células ASCs en distintas áreas corporales, no varían su potencial de diferenciación en otras líneas celulares, ni en la expresión de marcadores de superficie celular, ni tampoco influye la edad ni el IMC en la frecuencia de aparición de ASCs (Jurgens et al., 2008).

Yang et al. (2010) realizó en 30 ratas colgajo random de 9x3cm en la región dorsal, se comparó la administración de trasplante subcutáneo alogénico de 4×10^6 ASCs, y 1×10^8 células troncales derivado de células mononucleares de médula ósea (BM-MNCs) versus grupo control. Evidenció un porcentaje de sobrevivencia del colgajo de un 50% en el grupo BM-MNCs, 46% en el grupo ASCs, los cuales fueron significativamente superiores al grupo control con un 26%. No hubo diferencias significativas en los dos grupos tratados. Respecto a la densidad capilar, el grupo tratado con BM-MNCs resultó superior al grupo ASCs. Ambos mostraron

niveles superiores de VEGF y bFGF respecto al grupo control, siendo este último factor superior en BM-MNCs respecto a las ASCs y grupo control.

A pesar de las ventajas del uso de las BM-MSCs para aumentar la sobrevivencia del colgajo, no parece ser mejor respecto a las ASCs, tanto por no mostrar diferencias significativas, cómo por ser un procedimiento invasivo y doloroso para la recolección de estas células, encontrarse proporcionalmente en menor cantidad en el individuo en comparación al tejido adiposo, y por su disminución de la capacidad de proliferación y diferenciación en otros linajes celulares con la edad (Rebelatto et al., 2008).

2.4 Precondicionamiento de las células madres

A pesar de que rápidamente el tratamiento con células madres se ha desarrollado como un tratamiento regenerativo potencial para varias enfermedades tales como accidente cerebrovascular, infarto cardiaco, heridas, falla renal, entre otros. Se han ignorados varios aspectos y problemas tales como: diferenciación celular, sobrevida de las células trasplantadas en un lugar hostil sometida a isquemia e hipoxia, citotoxicidad, especies reactivas de oxígeno, respuesta inflamatoria, activación de cascada apoptótica, entre otros (Yu et al., 2013).

Varios agentes preconditionantes se han utilizado en las células madres. Estos mediante un insulto subletal a través de isquemia, hipoxia, anoxia, ácido sulfhídrico (H₂S), peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y monóxido de carbono (CO) (Yu et al., 2013).

La exposición a hipoxia se puede realizar a concentraciones del 1% al 5% de O₂. La exposición a concentraciones del 1% es óptimo para la promoción de las propiedades pro angiogénicas a través de un aumento de la expresión del VEGF, mientras que la exposición a 5% de O₂ presenta mayor proliferación celular. Además presenta la ventaja de preservar su estado multipotencial, el cual puede perdurar períodos prolongados hasta por 2 meses (Prasad et al., 2014; Yang et al., 2012).

Las células madres preconditionadas con hipoxia aumentarían la resistencia a injurias a través de la expresión de señales protectoras tales como el factor inducible a hipoxia (HIF -1). La hipoxia induciría la formación del complejo HIF-1 a través de un proceso de síntesis proteica. Este complejo está formado por dos subunidades. La HIF-1b se expresa constitutivamente en todas las células, mientras que la subunidad HIF-1a se expresa solamente en condiciones de hipoxia. Este factor se degrada en condiciones de normoxia y se acumula rápidamente luego de la exposición a una baja tensión de oxígeno (Salceda & Caro, 1997).

La translocación y la activación a nivel nuclear sería la causante de la producción de varios genes “río abajo” codificadores de eritropoyetina (Epo), VEGF entre otros, los cuales estimularían los mecanismos endógenos de la angiogénesis. (Yu et al., 2013; Salceda & Caro, 1997).

Otros genes diana de la HIF-1 como el CXCR4 y codificadores proteínas de la matriz extracelular (MMPs) estarían involucrados en la migración celular. Y otros responderían a mediadores inflamatorios y distintas citoquinas, aumentaría la producción del óxido nítrico sintetasa (iNOS) y activación de genes antioxidantes. (Yu et al., 2013; Mahfoudh-Boussaid et al., 2011)

También está descrito un aumento de la tolerancia a la apoptosis reflejado por una disminución de la muerte celular in vitro y en el área isquémica o peri infarto. (Yu et al., 2013; Wei et al., 2012).

En relación al uso de estas células en heridas y colgajos, en el trabajo de Lee et al. (2009) en 4 ratas sometidas a dos lesiones de espesor completo de 8mm de diámetro en el área dorsal. Evidenció que la herida tratada con ASCs preconditionadas con hipoxia, mejoraban significativamente su capacidad de curación por medio de una regulación a la alza de VEGF y bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) respecto a la herida tratada con ASCs en condiciones de normoxia. Interesantemente luego de la inhibición de VEGF y bFGF por medio de anticuerpos, revirtieron los efectos de migración de los fibroblastos y el proceso de curación de la herida. Los efectos de la hipoxia (1% O₂) en las BM-MSCs durante 48 hrs previos al trasplante en colgajo random en ratas, significó un aumento significativo del área de sobrevivencia del colgajo y de la densidad

microvascular respecto al grupo trasplantado de BM-MSCs en condiciones de normoxia (20% O₂) (Wang et al., 2011).

Finalmente en la investigación presente, y de acuerdo a lo documentado, se plantea que las células madres precondicionadas con hipoxia a través de un mecanismo protector, presentaría un aumento de la sobrevivencia en una zona hostil como lo es el colgajo isquémico, esto a través de mejoras en la migración y expresión de factores tróficos estimulantes de la angiogénesis, activación de mediadores antioxidantes, asociado a la mantención de un estado multipotencial al momento de la administración, para luego diferenciarse y promover la reparación y regeneración tisular. La combinación de estos efectos resultaría alentador y a la vez superior a los otros métodos descritos tales como las células madres no precondicionadas, como al fenómeno de retardo de colgajo el cual a su vez es superior a muchos otros métodos farmacológicos.

HIPÓTESIS

El acondicionamiento de las ASCs mediante hipoxia, resulta ser el método más efectivo para disminuir el área de necrosis en colgajo cutáneo random predispuesto a necrosis en su zona distal en ratas.

OBJETIVO GENERAL

-) Evaluar y comparar el área de necrosis y supervivencia del colgajo cutáneo random luego del tratamiento con ASCs, ASCs acondicionadas con hipoxia y retardo del colgajo respecto al grupo control.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-) Lograr aislar y cultivar las ASCs en condiciones de normoxia (21%O₂ y 5% CO₂) y en hipoxia (2%O₂ y 5% CO₂) a partir de tejido adiposo del área inguino abdominal en ratas.
-) Describir la morfología de las ASCs mediante visualización directa con microscopio invertido, mediante inmunofluorescencia con el marcador vimentina y CD90 (Thy-1) utilizando como anticuerpo secundario el FITC.
-) Evaluar proliferación y migración celular de las ASCs en condiciones de normoxia e hipoxia.
-) Evaluar y comparar el área de necrosis del colgajo cutáneo random luego del tratamiento con ASCs, ASCs acondicionadas con hipoxia y retardo del colgajo respecto al grupo control.
-) Realizar una clasificación de necrosis y otorgar un SCORE según los cambios isquémicos/necróticos del colgajo al séptimo día, utilizando características macroscópicas e histológicas.
-) Evaluar y comparar cualitativamente la revascularización por medio de inmunohistoquímica con el marcador VEGF en el grupo control y grupos tratados.
-) Evaluar y comparar la proporcionalidad de colágeno I/III en la clasificación de necrosis

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de estudio:

40 ratas Sprague-Dawley de sexo masculino, de peso entre 300-500gr serán intervenidas bajo las normas bioéticas del ICBM para la experimentación con animales de laboratorio. Las ratas son anestesiadas con ketamina 80mg/kg y xilacina 8mg/kg vía intramuscular. Preoperatoriamente se administra penicilina benzatina 40.000 U/Kg IM. Luego de la anestesia general se interviene según el grupo perteneciente. Las ratas serán randomizadas en 4 grupos: grupo control (N° = 10), grupo intervenido mediante retardo del colgajo (RTC) (N° = 10), grupo intervenido con células madres derivadas de tejido adiposo adultas (ASCs) (N° = 10) y grupo intervenidas con células madres derivadas de tejido adiposo adultas precondicionadas con hipoxia (ASCs-H) (N° = 10) (Figura 4).

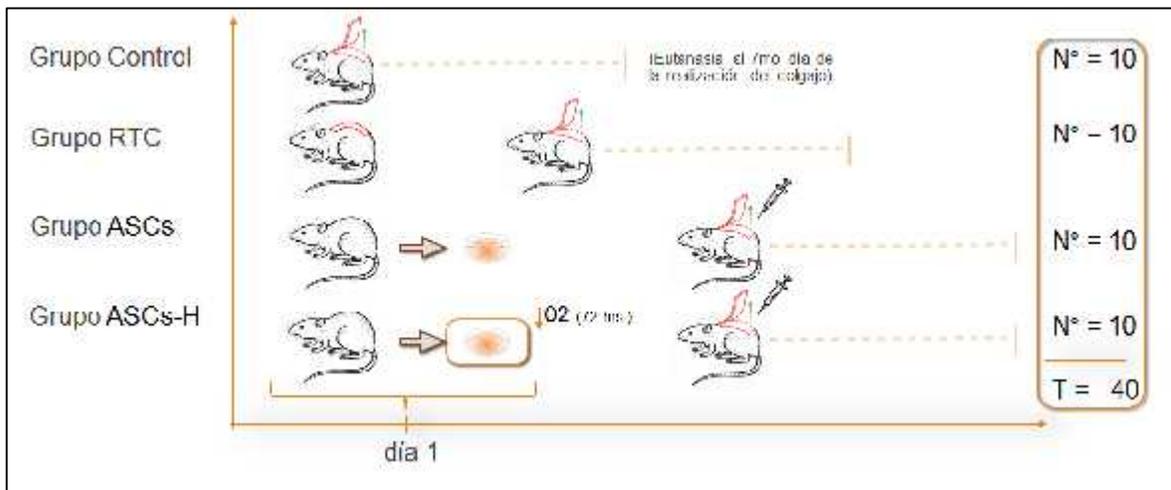


Figura 4:

Se esquematiza el diseño de estudio experimental. En el grupo control se realiza el colgajo cutáneo random en el día 1. En el grupo RTC se realiza la incisión del colgajo sin elevación de este para luego en un segundo tiempo quirúrgico (al quinto día), se realiza elevación de éste. En los grupos de ASCs y ASCs-H se obtiene ASCs de la región inguinoabdominal. Las ASCs serán expandidas y cultivadas en una incubadora en condiciones de normoxia (21%O₂ – 5%CO₂), mientras que el grupo ASCs-H 72 horas previo a su uso, serán sometidas a hipoxia a una concentración de O₂ al 2% y CO₂ al 5%. En un segundo tiempo quirúrgico, posterior a la realización del colgajo y reposición de éste en su lugar original, se inyectará a nivel subcutáneo en 10 zonas demarcadas específicamente. A la totalidad de las ratas se les realizará eutanasia al séptimo día de realizado el colgajo cutáneo random.

RTC: retardo del colgajo, ASCs: células madres derivado de tejido adiposo, ASCs-H: células madres derivadas de tejido adiposo adultas precondicionadas con hipoxia.

Técnica quirúrgica:

Luego de la anestesia general, se rasura la región dorsal. En condiciones de asepsia y antisepsia, los animales serán colocados en posición decúbito ventral y se dibujará un rectángulo cuyo margen craneal se realiza a nivel de la cintura escapular y caudal a nivel de la cintura pélvica. La incisión del colgajo se realiza con bisturí número 23. El colgajo que se elevará, tendrá un ancho de 2 cm conservando su pedículo cranealmente y largo de 8cm, de grosor que involucre piel y tejido celular subcutáneo. Luego se coloca en el lecho una lámina de silicona (Parafilm M®) (previamente sumergido en alcohol de 70° y luego sometido a luz ultravioleta durante 15min) de 1mm de grosor, con un ancho y largo que logra la cobertura total del lecho, se fija en el lecho utilizando catgut 4-0 en sus cuatro esquinas. Posteriormente el colgajo será reposicionado y suturado cuidadosamente con nylon 4-0. Se realiza demarcación de 10 zonas en el colgajo donde se inyectarán soluciones que diferirán según el grupo intervenido. Tanto en el grupo control como en el grupo RTC, se administrará DMEM preparado (Dulbecco's modified Eagle's Medium, 10% de suero bovino fetal, 1% antibióticos y antimicóticos) 0.1ml en las 10 zonas marcadas (total de administración 1 ml) y en los grupos ASCs y ASCs-H se administrarán estas células resuspendidas en DMEM preparado (Figura 5).

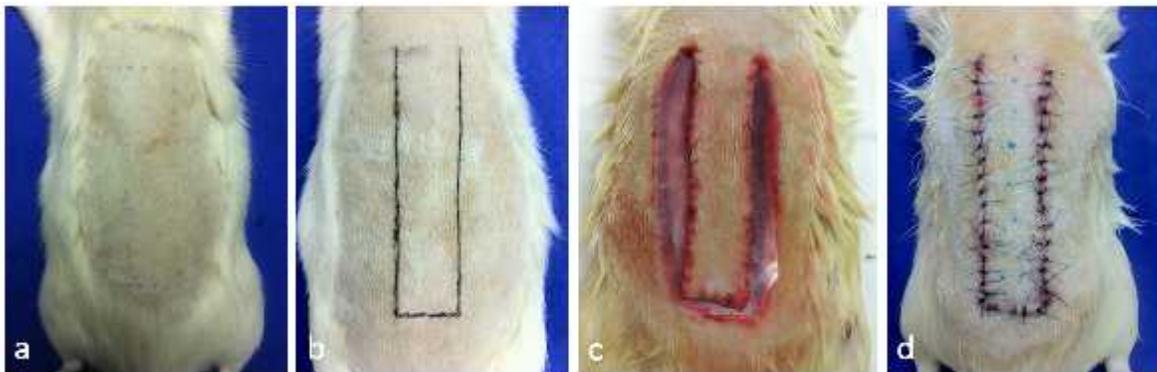


Figura 5:

- a.- Rata en decúbito ventral con región dorsal rasurada. Mediante un molde con el diseño de 2x8 cm. Se realiza el diseño inicial del colgajo.
- b.- Unión de los puntos para lograr el diseño final del colgajo cutáneo de 2x8 cm, manteniendo su pedículo en proximidad a la región escapular.
- c.- Incisión de bordes del colgajo y elevación de éste y colocación de lámina de silicona en el lecho.
- d.- Reposición del colgajo y sutura. Demarcación de 10 lugares en el colgajo.

Grupo Retardo del Colgajo:

Luego de la anestesia general la región dorsal es rasurada. En un primer tiempo quirúrgico en condiciones de asepsia y antisepsia se dibujará un rectángulo cuyo margen craneal se ubica a nivel de la cintura escapular y caudal a nivel de la cintura pélvica. Se realiza incisión del colgajo con bisturí número 23 para luego suturar inmediatamente el colgajo en su posición, sin realizar elevación de éste. Posteriormente al quinto día postoperatorio, se realiza el procedimiento detallado en el apartado de técnica quirúrgica.

Grupo ASCs y ASCs-H:

Luego de la anestesia general, los animales son colocados en posición decúbito supino. Se realiza una incisión con bisturí número 23 en la región inguinal hasta exposición del tejido adiposo subcutáneo para la extracción de éste. Posteriormente se realiza hemostasia y sutura con nylon 4-0 (Figura 6). Luego de la obtención de ASCs de la misma rata según apartado detallado posteriormente en “obtención de ASCs”, se somete a una segunda intervención quirúrgica al momento de lograr una concentración adecuada de estas células. En este momento se realiza el colgajo con elevación y reposición de éste, para luego inyectar 0.1ml de concentrado de ASCs o ASCs-H según corresponda, en 10 zonas igualmente distribuidas desde la zona craneal hacia caudal.

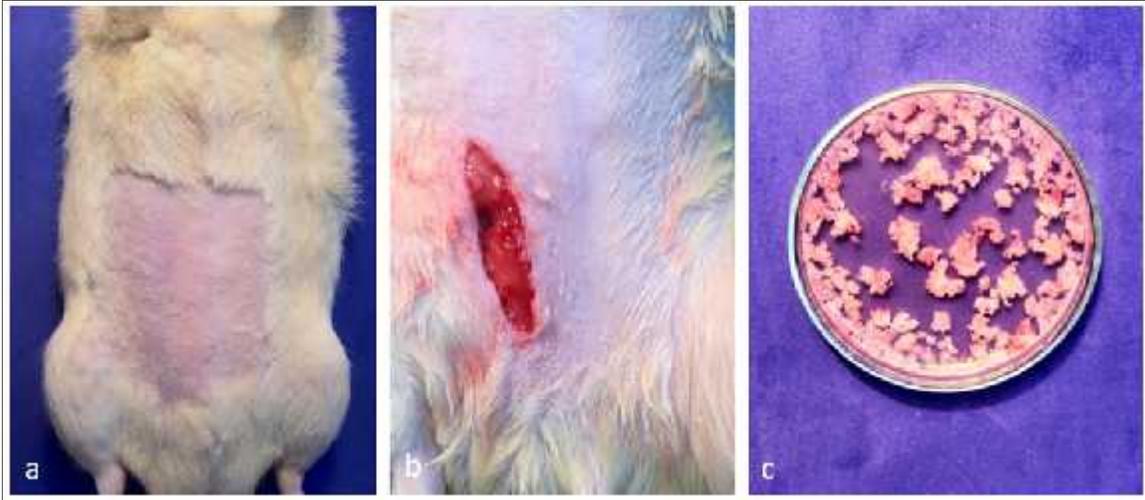


Figura 6:

a.- Rata en posición supina con rasuración del área inguinoabdominal.

b.- Incisión con bisturí y exposición de tejido graso subcutáneo.

c.- El tejido graso es fraccionado en placa de Petri con solución buffer fosfato 1x.

Obtención de ASCs:

El tejido adiposo del área abdominal de la rata es fraccionado y lavado con solución buffer-fosfato 1x (DPBS, GIBCO, Cod: 14190144), digerido con colagenasa tipo II al 0,15% (Sigma-Aldrich, Cod: C6885) por 60min a 37°C y neutralizado con medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO, Cod:11995) 10% de suero bovino fetal (FBS, GIBCO, Cod: 10270), 1% antibióticos y antimicóticos (Antibiotic-Antimycotic 100X, GIBCO, Cod: 15240) . Posteriormente se centrifuga por 10min a 1200g. El pellet obtenido es resuspendido en medio de cultivo y analizado. Según el grupo, las ASCs se mantienen en condiciones de normoxia (21%O₂ – 5%CO₂) en la totalidad del proceso de expansión celular hasta la administración en el sitio de interés, mientras que las ASCs-H en la mitad del proceso se realiza tripsinización (0.25% Trypsin-EDTA (1X), GIBCO,Cod:25200) de las células para luego colocarlas en DMEM preparado previamente sometido a hipoxia por 24 horas en una cámara de hipoxia (Modular Incubator Chamber). Luego de 72 horas en estas condiciones (2% O₂, 5% CO₂) se tripsinizan nuevamente para lograr el conteo celular mediante hemocitómetro. Posteriormente se colocan en un volumen total de 1 ml para ser administradas en el colgajo cutáneo random (Figura 7).

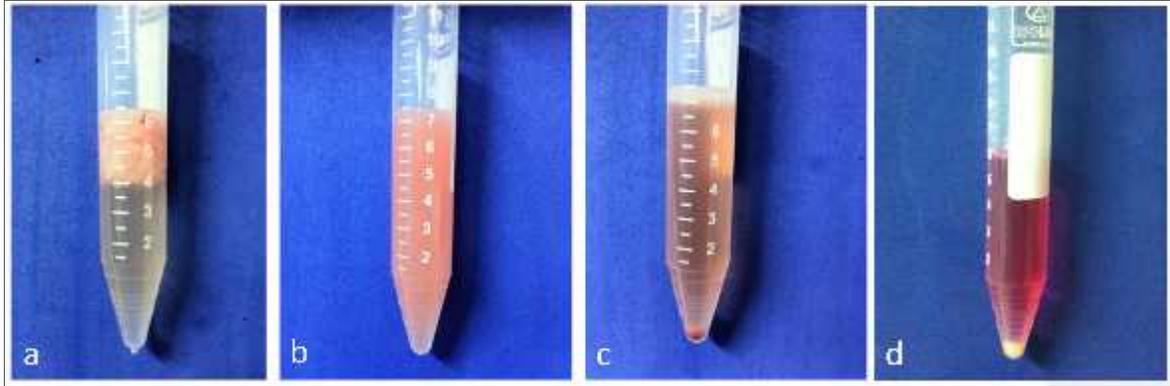


Figura 7:

- a.- Recolección de tejido adiposo fraccionado en solución buffer fosfato 1x y colagenasa tipo II.
- b.- Tejido graso digerido mediante colagenasa tipo II.
- c.- Obtención del pellet luego de la centrifugación.
- d.- Resultado final luego de expansión de las ASCs al cabo de 10 días, tripsinización y centrifugación.

Inmunohistoquímica:

Se coloca un cubre objeto estéril sobre cada uno de los cultivos durante el segundo pasaje para la adhesión de células. Luego de 3 días se extrae el cubre objeto y se sumerge en una placa de petri por 6 minutos en metanol a -20°C y 1 minuto en acetona a -20°C , para luego pasarlo por tampón fosfato por 5 minutos y cubrirlo con suero de cabra 1/10 en PBS-BSA al 2% dejándolo en una cámara húmeda por 30 minutos. Se utiliza el anticuerpo primario vimentina (Dako) 1/100 como marcador de filamentos intermedios citoplasmáticos de las células madre y el anticuerpo CD90 (Thy-1) 1/100 (Chemicon) como marcador de proteína de superficie celular. Se deja 1 noche en refrigeración. Posteriormente, se utiliza IgG FITC (Vector) 1/200, como anticuerpo secundario. Utilizando la técnica de Propidio (Polysciences) 1/500 es posible destacar la cromatina de los núcleos en color rojo. Montaje en medio acuoso (DakoR Faramount, S3025). Visualización en microscopio de fluorescencia UV con filtro mixto.

Estudio de proliferación celular:

Durante el segundo pasaje de un cultivo celular en condiciones de normoxia, se tripsiniza y se toman 2 muestras y se colocan en 2 frascos de cultivo celular en concentraciones equivalentes, uno se mantiene en condiciones de normoxia (21%O₂ – 5%CO₂) y el otro cultivo celular en hipoxia (2%O₂ – 5%CO₂) (Modular Incubator Chamber), con DMEM preparado que previamente ha estado sometido a hipoxia durante 24 horas. Se mantienen durante 24 horas en estas condiciones y nuevamente se tripsinizan y se obtienen 10 muestras de ambos cultivos para luego realizar el conteo celular mediante hemocitómetro. A partir de otro cultivo celular se realiza este mismo procedimiento pero realizando el conteo celular a las 72 horas en las condiciones descritas.

Estudio de migración celular:

De un cultivo celular durante el segundo pasaje en condiciones de normoxia, se tripsinizan las células y se colocan sobre 16 cubre objetos en cantidades equivalentes. 8 cubre objetos se colocan en placas de Petri en condiciones de normoxia (21%O₂ – 5%CO₂) y las 8 restantes en condiciones de hipoxia (2%O₂ – 5%CO₂) utilizando DMEM preparado sometido previamente a hipoxia durante 24 horas. Se espera confluencia celular de 90% para posteriormente de un vértice del cubre objeto, se retiran 10 mm de células adheridas mediante la utilización de una micropipeta y se toma registro fotográfico con la Cámara Canon Power Shot A640 (Figura 8). 24 horas después se realiza un nuevo registro fotográfico y mediante la utilización del programa ImageJ, se realiza medición en mm de la migración celular (Figura 9).

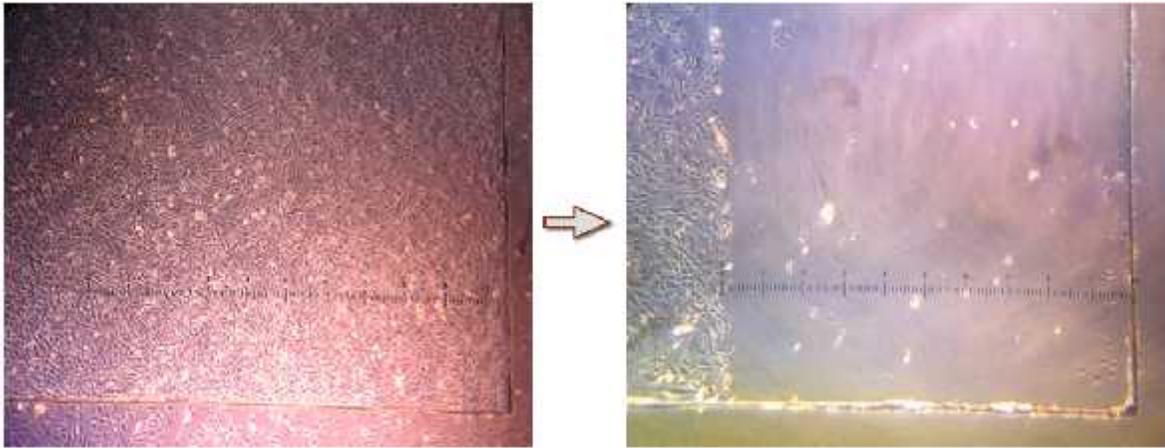


Figura 8:

A la izquierda se observa vértice de cobre objeto con cultivo celular de células madres con confluencia celular en un 100%, a la derecha se realizó retiro de 10 mm de las células adheridas con micropipeta, tomando como referencia el borde del cobre objeto. Aumento 10x.

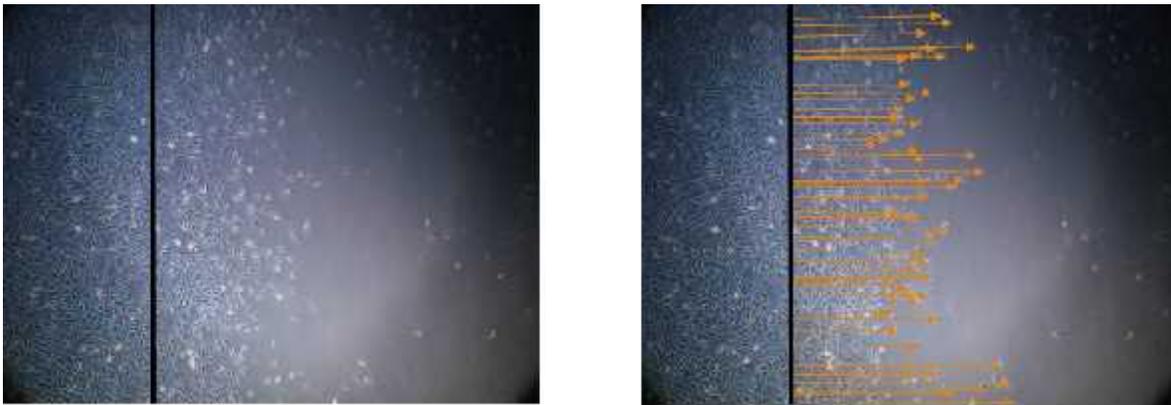


Figura 9:

Fotografía obtenida luego de 24 horas después del retiro de las células madres adheridas al cobre objeto. La línea en color negro representa el punto inicial (distancia de los 10mm respecto al borde del cobre objeto). A partir de este punto, se obtiene las distancias en mm de las células que más se alejaron respecto al punto de partida. Aumento 10x.

Método de cuantificación de isquemia y necrosis del colgajo random:

Luego de una semana de la intervención quirúrgica y de anestesia general se realiza eutanasia con solución de eutanasia 0,1 ml a nivel intratorácico. Se toman imágenes digitales del colgajo a una distancia estandarizada para posterior análisis en computadora mediante el programa ImageJ 1.45s. Las zonas son categorizadas en áreas necróticas y área total, manteniendo como bordes los límites del colgajo.

Los resultados son expresados en áreas de necrosis en relación al área total del colgajo.

Además se identificó distintos grados de necrosis en el colgajo cutáneo random al séptimo día postoperatorio tomando en cuenta características al examen físico (coloración y textura) y cambios histopatológicos. Se realizó una clasificación de necrosis otorgando un puntaje del 0 al 3 desde piel sana hasta colgajo con necrosis de mayor grado. Por último se obtuvo un score de necrosis multiplicando el área de necrosis y el puntaje según la clasificación.

Estudio microscópico:

Para el análisis histológico, luego del séptimo día de la realización del colgajo, se practica la eutanasia para luego retirar el colgajo del área dorsal. Se obtienen secciones de tejido de 4 zonas de proximal a distal (a 1, 3, 5 y 7 cm aproximado desde la base del colgajo) y categorizados en zona 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Se fijan en Duboscq Brasil durante 6 horas y luego se mantienen en alcohol de 70°. Posteriormente son embebidas en parafina y cortadas transversalmente con micrótopo (Micron). Se realizan las tinciones de hematoxilina y eosina, Tricrómico de Masson y Picro-Sirius para la observación de colágeno tipo I y III con luz polarizada y análisis computacional con el programa Image-Pro® Plus Version 6.0 para evaluación de la proporcionalidad de colágeno I/III (Figura 9). Con la tinción Picro-Sirius con luz polarizada, las fibras de colágeno gruesas y organizadas, presenta birrefringencia intensa en color rojo correspondiente al colágeno tipo I, mientras que en verde claro se observa el colágeno tipo III con birrefringencia más débil (Montes & Junqueira, 1991; Kamath et al., 2013) (Figura 10). Para el estudio cualitativo de células endoteliales y revascularización, se realiza tinción inmunohistoquímica con VEGF 1:500 (Santa Cruz Biotechnology).

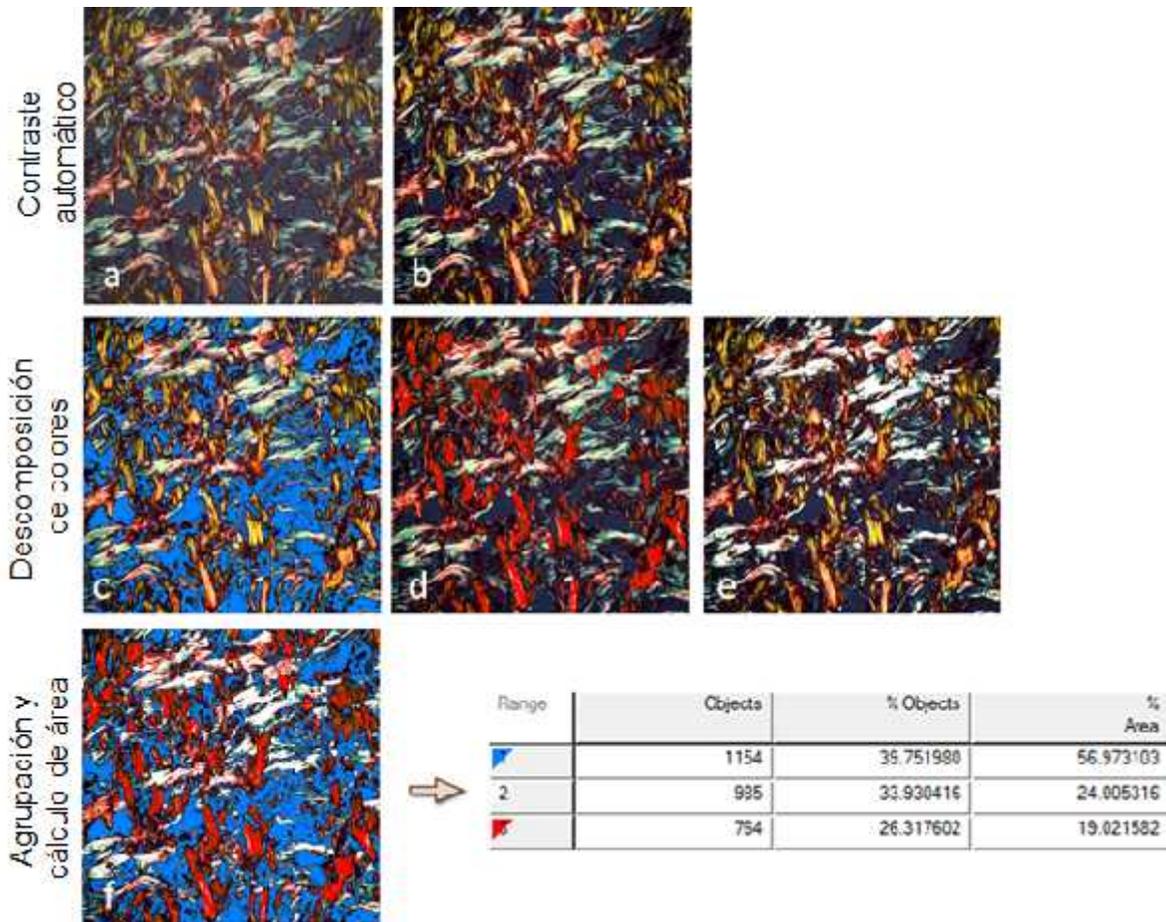


Figura 10:

Se ilustra el método para cuantificación de colágeno I y III. (a) Imagen directa de corte histológico con tinción Picro-Sirius con luz polarizada, aumento 400x. (b) Optimización automática de contraste de la imagen en (a) (aplicación Best Fit del software Image-Pro® Plus Version 6.0). Descomposición de colores dejando en azul el fondo(c), rojo colágeno I(d) y blanco colágeno III(e). Agrupación de los colores en la imagen (f) y cuantificación del porcentaje de área de cada uno (tabla).

Análisis estadístico:

Se utilizaron las pruebas estadísticas de T de Student utilizando significancia estadística $p = 0,05$. Se utiliza el software MedCalc 12.5.

RESULTADOS

Aislamiento y cultivo de las ASCs en condiciones de normoxia y en hipoxia:

Se utilizaron en promedio 1,64gr +/-1,13 de tejido adiposo de área inguinoabdominal en el grupo de ASCs gr y 0,93gr +/-0,34 en el grupo ASCs-H para el aislamiento de ASCs. Se logró una concentración celular de ASCs $9,95 \times 10^6 \pm 7,3 \times 10^6$ células/ml y en el grupo ASCs-H $1,5 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$ células/ml manteniendo una viabilidad celular de >99%. Bajo visualización directa mediante microscopio invertido, se pudo observar su adherencia al plástico y morfología característica tipo fibroblasto a partir del primer cambio de medio de cultivo, al cuarto día estas células se agrupan formando colonias y al séptimo día ya se puede observar confluencia celular cercano al 90% (Figura 11). Mediante inmunofluorescencia, se obtuvo tinción positiva indistintamente para el grupo ASCs como ASCs-H para el anticuerpo primario vimentina (Dako) 1/100 (marcador de los filamentos intermedios) (Figura 12), como también positiva para el anticuerpo primario el CD90 (Thy-1) 1/100 (marcador de proteína de superficie celular). Este último presentó positividad en más del 90% de las células tanto en condiciones de normoxia como en hipoxia al 2% de O₂ (Figura 13).

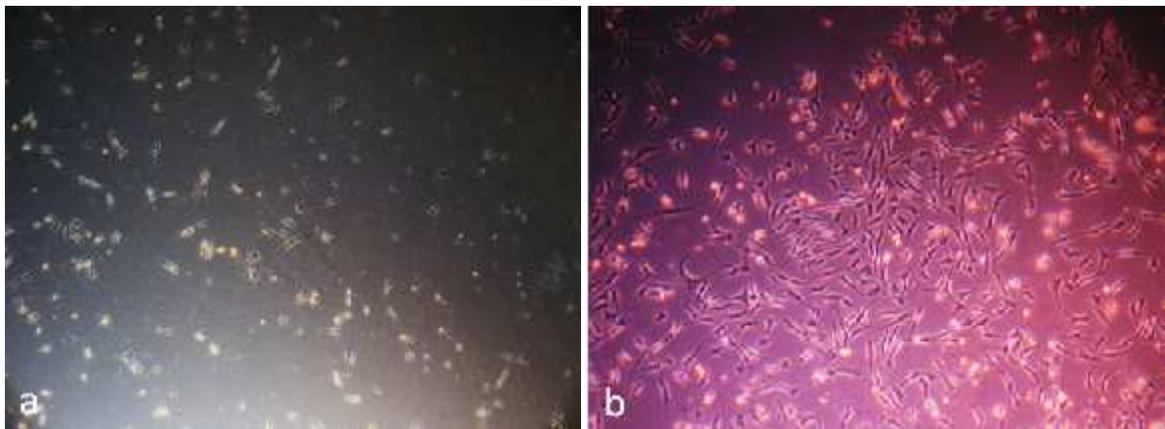




Figura 11:
 Visualización directa de las ASCs mediante microscopio invertido al segundo día (a), cuarto día (b) y al séptimo día (c) de cultivo celular. Se observa su morfotipo que recuerda a los fibroblastos. Aumento 40X.

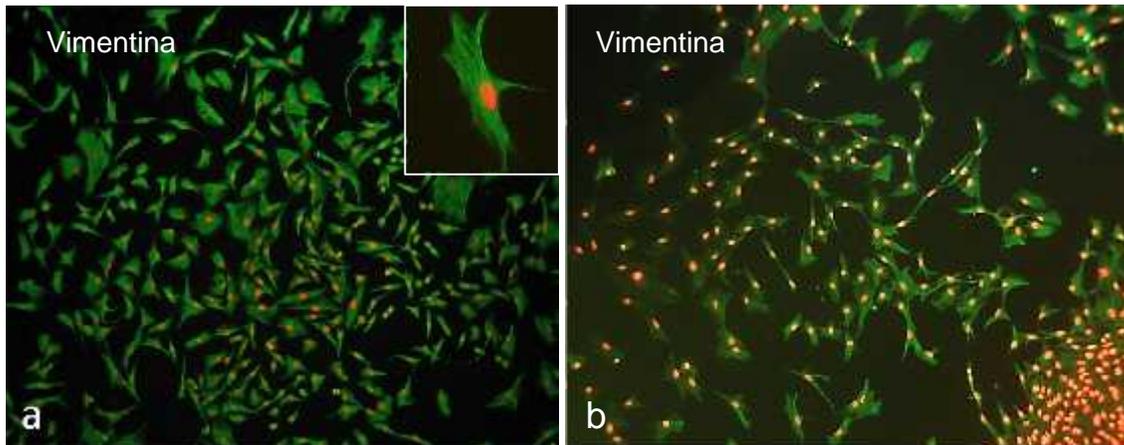


Figura 12:
 Inmunofluorescencia en ASCs (a) y ASCs-H (b) utilizando anticuerpo primario vimentina 1/100 y anticuerpo secundario FITC 1/200 (verde). (Polisetty et al., 2008) Tinción de los núcleos celulares con color rojo mediante Yoduro de Propidio (Polysciences) 1/500. Nótese gran confluencia celular en la esquina inferior derecha en (b). Aumento 100X.

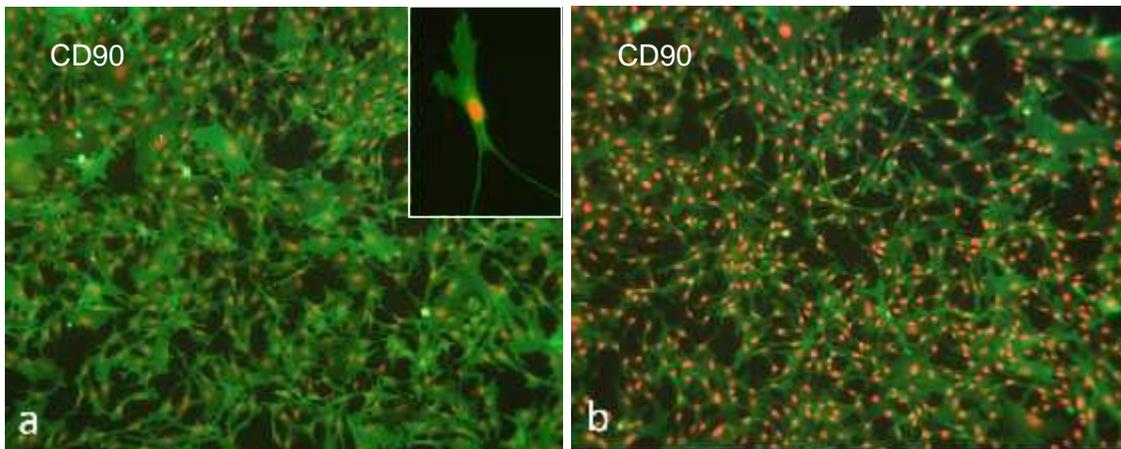


Figura 13:

Inmunofluorescencia utilizando anticuerpo primario CD90(Thy-1) 1/100 como marcador de superficie celular, anticuerpo secundario FITC 1/200 (verde). (Polisetty et al., 2008) Tinción de núcleo celular con color rojo mediante Propidio (Polysciences) 1/500 en ASCs (a) y ASCs-H (b) se observa que la mayoría de las células resultaron positivas en ambos cultivos celulares sin diferencias entre ellas. Aumento 100X.

Estudio de proliferación celular:

Durante el segundo pasaje de cultivo celular de ASCs en condiciones de normoxia, se tripsiniza y se divide en dos frascos en concentraciones equivalentes, $3,61 \times 10^5 \pm 1,50 \times 10^5$ céls/mL y $3,63 \times 10^5 \pm 1,14 \times 10^5$ céls/mL respectivamente ($p=0,96$). Uno se mantiene en condiciones de normoxia mientras que el otro se somete a hipoxia utilizando DMEM preparado hipóxico. Después de 24 horas se tripsiniza y se realiza conteo celular de ambos cultivos, obteniendo 10 muestras de cada uno. Se obtiene como resultado un aumento significativo de la concentración celular en condiciones de hipoxia, ($5,42 \times 10^5 \pm 1,03 \times 10^5$ céls/mL) en comparación al grupo en normoxia ($3,26 \times 10^5 \pm 8,61 \times 10^4$ céls/mL) ($p < 0,001$).

Se realiza este mismo procedimiento a las 72 horas con otro cultivo celular, logrando la misma tendencia de aumento de proliferación celular en hipoxia, obteniendo como resultado en el grupo en condiciones de normoxia $1,31 \times 10^5 \pm 3,71 \times 10^4$ céls/mL y en el grupo en hipoxia $3,04 \times 10^5 \pm 1,13 \times 10^5$ céls/mL. ($p < 0,01$) (Figura 14).

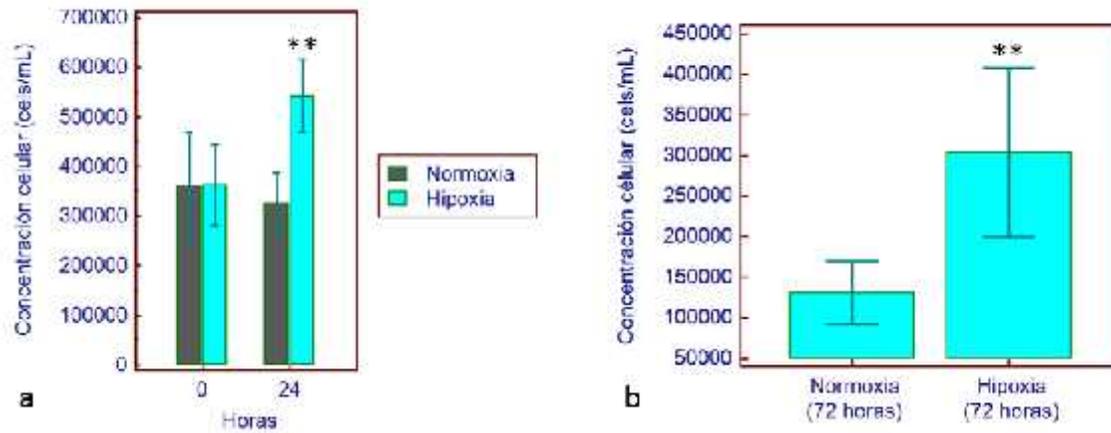


Figura 14: Figura que ilustra el aumento en la concentración celular en condiciones de hipoxia a las 24 en (a) y 72 horas en (b) en comparación al grupo sin preconditionamiento. (** = $p < 0,01$)

Estudio de migración celular:

Luego de lograr confluencia celular $>90\%$ en los cubres objetos, mediante la utilización de una micropipeta se retira 10 mm de células adheridas de uno de los vértices de cada cubre objeto. Se realiza medición de la migración celular a las 24 horas de cada cubre objeto obteniendo mayor capacidad migratoria en el grupo en condiciones de hipoxia ($2,24 \pm 0,82$ mm) en comparación al grupo que se mantuvo en hipoxia ($2,44 \pm 0,85$ mm) ($p < 0,01$) (Figura 15).

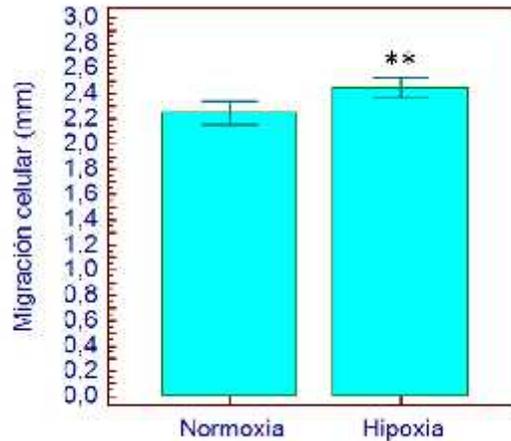


Figura 15:
Evaluación y comparación de la capacidad migratoria en mm de las células madres derivado de tejido adiposo en condiciones de normoxia en comparación a las que estuvieron sometidas en hipoxia, medición realizada luego de 24 horas (** = $p < 0,01$)

Caracterización de necrosis del colgajo cutáneo random:

Durante el desarrollo del trabajo al 7mo día se observaron variables grados de necrosis en el colgajo cutáneo random en los distintos grupos. Los grados de necrosis se clasificaron tomando en cuenta características al examen físico como lo es la coloración y textura y se correlacionó con los cambios histopatológicos (Figura 16). De esta forma se clasificó distintos grados de necrosis el cual se especifica en la tabla 1. Según se especifica en la tabla 1, el tipo 0 fue considerado como piel normal, mientras que el tipo 3 correspondió a la necrosis en su grado máximo. El examen físico de la piel sana, mantiene la coloración y textura elástica y blanda. A medida que va progresando la necrosis comienza a cambiar hacia un tono más oscuro, a su vez que la textura y consistencia va aumentando hasta tornarse acartonada y delgada. Esto se correlacionó directamente con un adelgazamiento progresivo de la dermis, atrofia del epitelio asociado a focos de desprendimiento, atrofia y necrosis de los anexos cutáneos, presencia de células fantasmas (células sin su núcleo), homogenización e hipereosinofilia del tejido conectivo (Vasilenko et al., 2013), presencia de infiltrado inflamatorio superficial y profundo y disminución de número de vasos sanguíneos. (Figura 17) De esta manera, aparte de realizar la medición correspondiente al área de necrosis, se le otorgó un puntaje del 0 al 3 (tipo

0=0, tipo 0+=0, tipo 1=1, tipo 2=2 y tipo 3=3) para analizar de mejor medida los cambios isquémicos/necróticos en los distintos grupos intervenidos mediante tinción de HE y Tricrómico de Masson (Figuras 18, 19 y 20) y análisis de la proporcionalidad de colágeno tipo I y III mediante el programa Image-Pro Plus 6 (Figuras 21 y 22). Por último se realizó la tinción de VEGF para evaluar la presencia de vasos de neo formación (Figura 23).

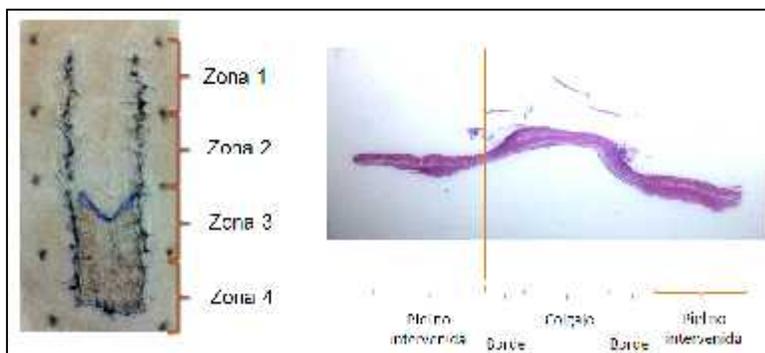


Figura 16: Se ilustra a la izquierda colgajo cutáneo random al séptimo día postoperatorio. Se divide en 4 zonas de proximal a distal. En este caso las zonas 1 y 2 corresponden al área de colgajo vital, zona 3 de transición y zona 4 de necrosis propiamente tal. A la derecha se muestra una imagen macroscópica del colgajo cutáneo en una sección transversal de espesor completo, con piel sana vecina a ambos lados.

Clasificación de necrosis					
	Vascularización	Tonalidad	Textura	Histología	P.e.
		oscura			
Tipo 0	Tejido sano	(-)	Normal.	Sin alteraciones.	0
Tipo 0+	Cambio adaptativo reversible	(-)	Normal.	Atrofia del epitelio, glándulas atróficas, sin atrofia de la dermis, sin homogenización del colágeno.	0
Tipo 1	Necrosis menor (Inflamación superficial)	(+/-/+)	Elasticidad conservada consistencia levemente aumentada.	Atrofia del epitelio con focos de desprendimiento. Atrofia y necrosis glandular, homogenización e hipereosinofilia de la matriz dérmica en forma parcial y en la superficie. Sin atrofia de la dermis. Infiltrado inflamatorio superficial.	1
Tipo 2	Necrosis menor (Inflamación profunda)	(++/+++)	Elasticidad disminuida, consistencia aumentada.	Atrofia del epitelio con focos de desprendimiento. Atrofia y necrosis glandular, homogenización e hipereosinofilia de la matriz dérmica en su totalidad, atrofia de la dermis <50% (>1mm de espesor), infiltrado inflamatorio superficial y profundo.	2
Tipo 3	Necrosis mayor	(+++/-+++)	Consistencia acartonada, no se logra plegar el tejido.	Atrofia del epitelio con extenso desprendimiento. Atrofia y necrosis de anexos. Atrofia de la dermis mayor al 50% (< 1 mm de espesor).	3

Tabla 1: Se ilustra la clasificación de necrosis tomando características macroscópicas de coloración de piel, textura y cambios histopatológicos. El puntaje asignado es mayor a medida que aumenta la necrosis.

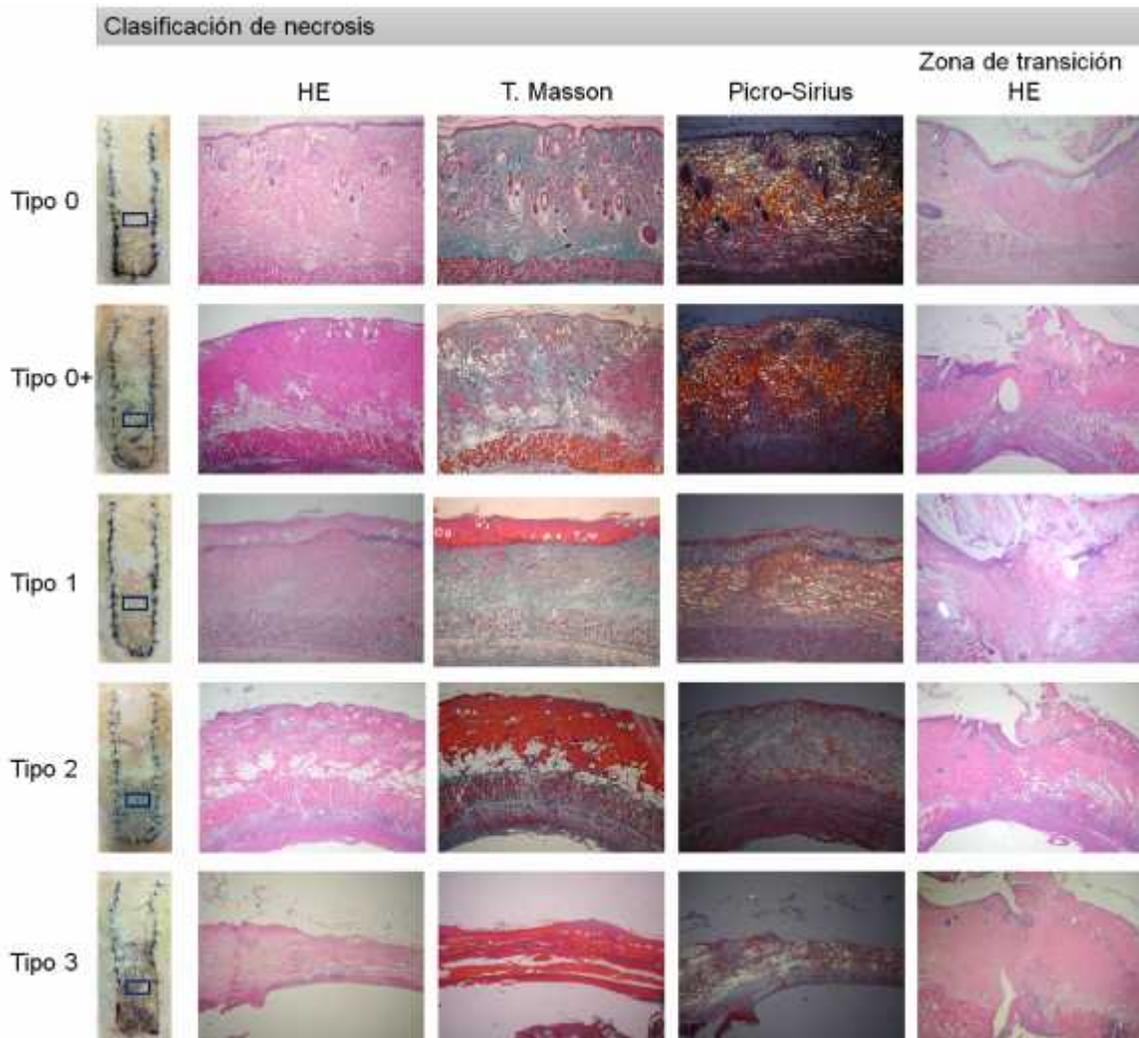


Figura 17:

Se ilustra los distintos tipos de necrosis según la clasificación de la tabla 1, utilizando como referencia el examen macroscópico junto con su correlación histopatológica. Las muestras se obtuvieron de la zona 3 marcada en rectángulo. Se analizó utilizando las tinciones de Hematoxilina y Eosina (HE), Tricrómico de Masson y Picro-Sirius con luz polarizada. En la última columna a la derecha se observa la transición de piel no intervenida al colgajo.

En un primer momento antes de la necrosis (tipo 0+) se observa un adelgazamiento del epitelio y de sus anexos, sin cambios estructurales ni atrofia a nivel de la dermis ni tampoco de la capa de musculatura estriada. Posteriormente evoluciona a un infiltrado inflamatorio superficial, seguido de atrofia y desprendimiento epitelial, atrofia y necrosis glandular. Por encima del infiltrado inflamatorio superficial, se observa cambios a nivel del tejido conectivo con homogenización e hipereosinofilia, asociado a mayor presencia de colágeno tipo III detectado por un aumento en la birrefringencia débil en color verde claro y disminución progresiva de fibras de colágeno tipo I detectadas por una birrefringencia roja intensa del colágeno tipo 1 (Montes & Junqueira, 1991)(Kamath et al., 2013). Posteriormente este cambio a nivel del tejido conectivo abarca la totalidad de la matriz dérmica el cual se asocia a atrofia y a presencia de un infiltrado inflamatorio profundo además del superficial. Finalmente progresa a una atrofia marcada de la dermis con ausencia o escasez marcada de colágeno tipo I. Igualmente la capa muscular se encuentra atrofica y existe mínima presencia de infiltrado inflamatorio profundo a nivel de la hipodermis. En estos dos últimos estadios, se observa una marcada disminución de vasos sanguíneos. Muestras obtenidas del grupo de retardo de colgajo en los tipos 0 y 1, grupo ASCs en los tipos 0+ y 2 y grupo control en el tipo 3. Análisis histopatológico con aumento 40X.

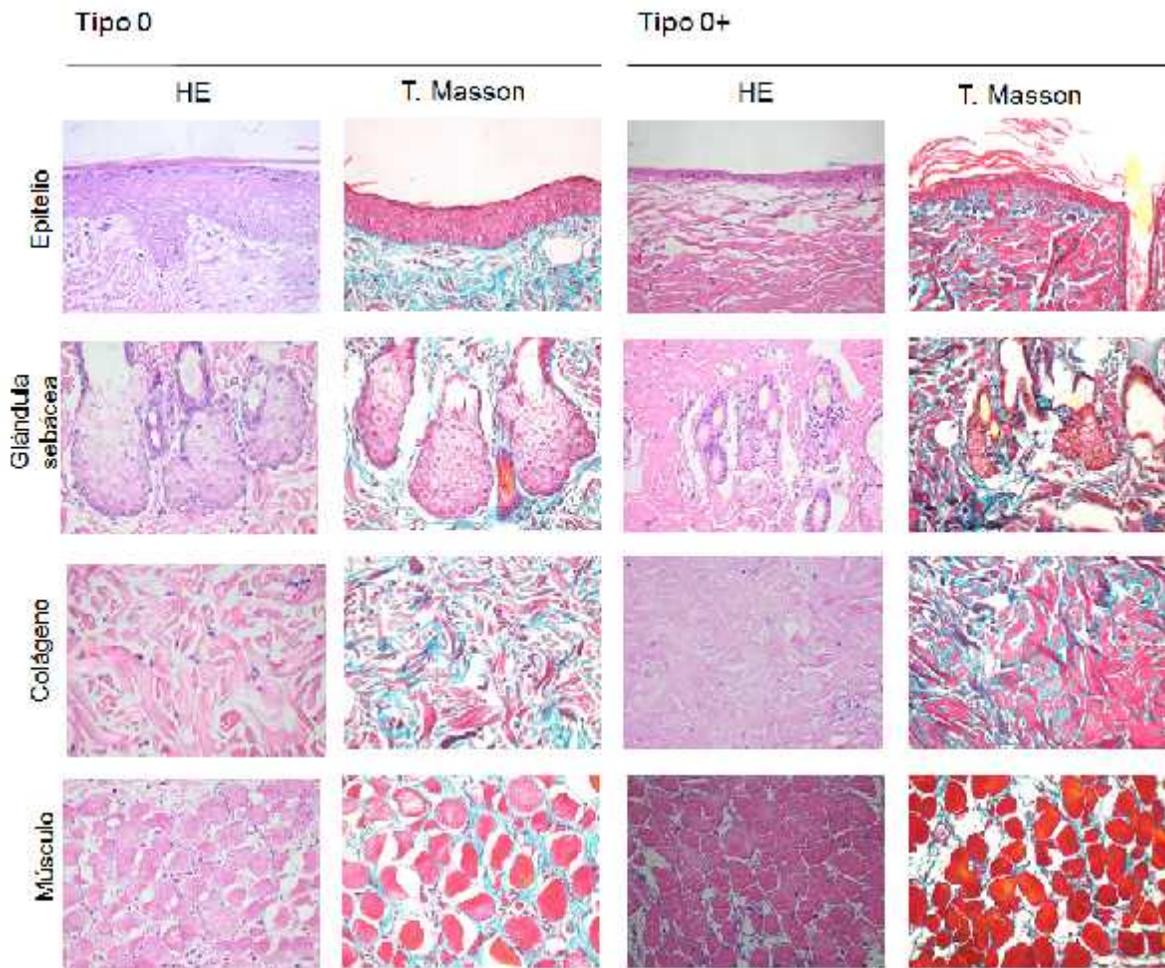


Figura 18:

Muestra histológica obtenida en zona del colgajo cutáneo random sin necrosis (tipo 0) y con cambios adaptativos reversible (tipo 0+). Se compara distintas estructuras (epitelio, glándula sebácea, colágeno y músculo estriado) con distintas tinciones. En la primera muestra se observa el epitelio de grosor normal, en la cual se logra identificar la totalidad de las capas que la componen. Las glándulas sebáceas con modalidad holocrina presentan su estrato germinativo normal. Las fibras de colágeno gruesas y organizadas. Y se observa el panículo carnoso, o capa de musculatura estriada bajo la dermis reticular. En el tipo 0+ se observa el epitelio y las glándulas sebáceas atróficas, sin zonas de desprendimiento epitelial ni de necrosis glandular. A nivel de la dermis se observa aún fibras de colágeno gruesas y parcialmente organizadas. No se observa variación histopatológica en la capa muscular. Hematoxilina y Eosina (HE), Tricrómico de Masson. Aumento 400X.

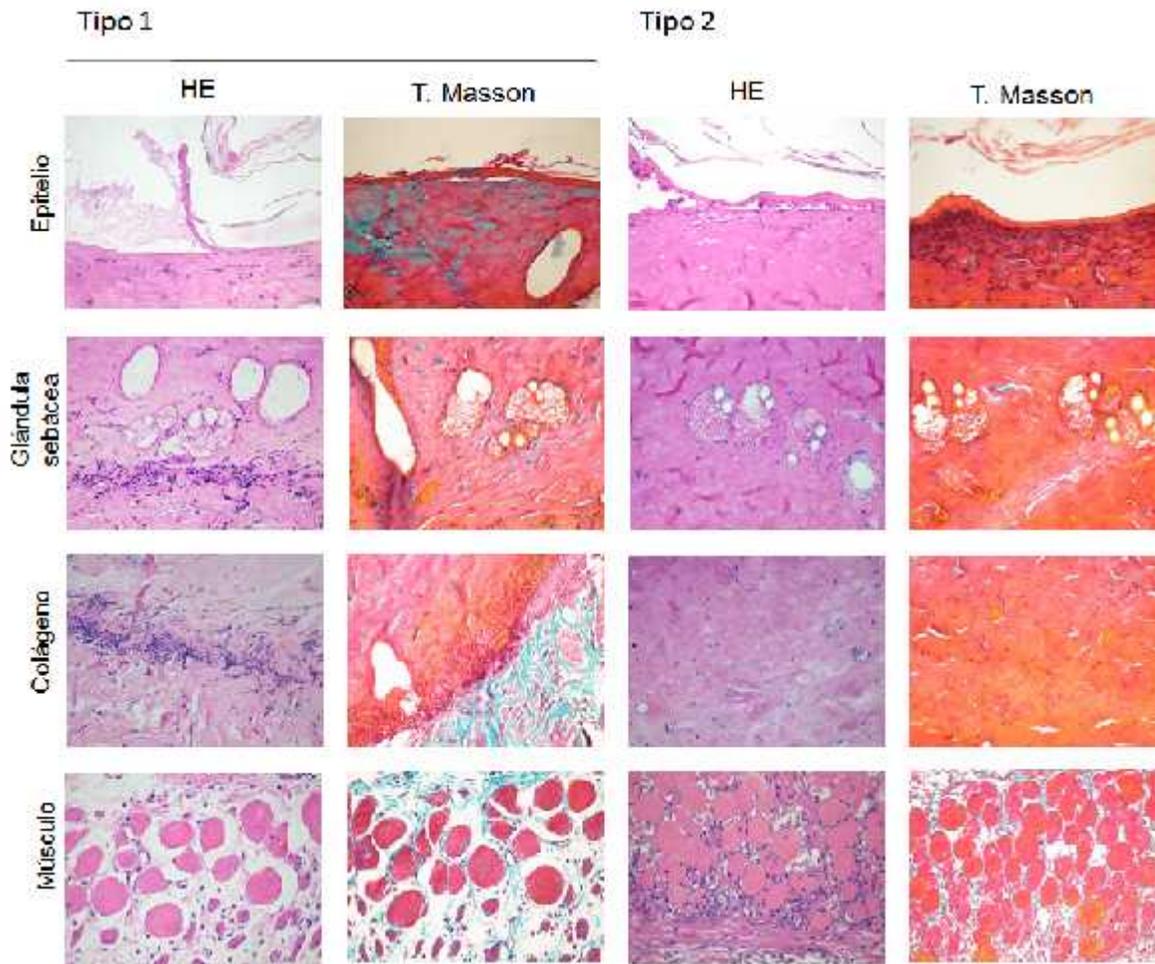


Figura 19:

Muestra histopatológica obtenida en zona de necrosis tipo 1 y 2 del colgajo cutáneo random. En el tipo 1 el epitelio se observa atrófico con focos aislados de desprendimiento. Glándulas atróficas y necróticas en menor medida (células de aspecto heterogéneo, con núcleos picnóticos adyacentes al estrato germinativo remanente). Característicamente en esta etapa se observa un infiltrado inflamatorio superficial que delimita a superior un tejido conectivo homogéneo e hipereosinofílico, mientras que bajo este aún presenta fibras de colágeno organizadas. Es evidente esta diferencia con la tinción de Tricrómico de Masson. En el tipo 2 el epitelio se observa atrófico y con zonas de desprendimiento. Glándulas sebáceas atróficas y necróticas en mayor medida. Presenta homogenización e hipereosinofilia que abarca la mayor parte de la dermis. Presenta un infiltrado inflamatorio profundo a nivel de la dermis reticular y capa de musculatura estriada, a expensas de un infiltrado inflamatorio superior en disminución. Presenta homogenización e hipereosinofilia de la totalidad de la dermis. Hematoxilina y Eosina (HE), Tricrómico de Masson. Aumento 400X.

Tipo 3

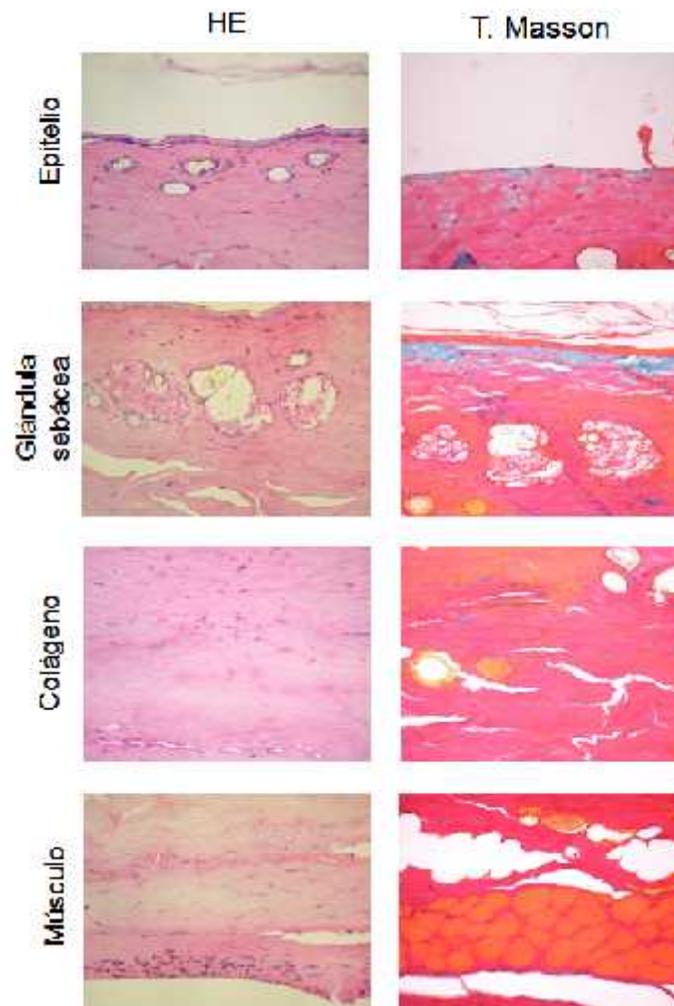


Figura 20:

Muestra histopatológica obtenida en zona de necrosis tipo 3 del colgajo cutáneo random. El epitelio se encuentra atrófico con focos de desprendimiento. Extensa necrosis glandular. Tejido conectivo homogéneo e hipereosinofílico que abarca todo el espesor de la dermis. Atrofia dérmica y de la capa muscular, escasa presencia de infiltrado inflamatorio a nivel de la hipodermis. Hematoxilina y Eosina (HE), Tricrómico de Masson. Aumento 400X.

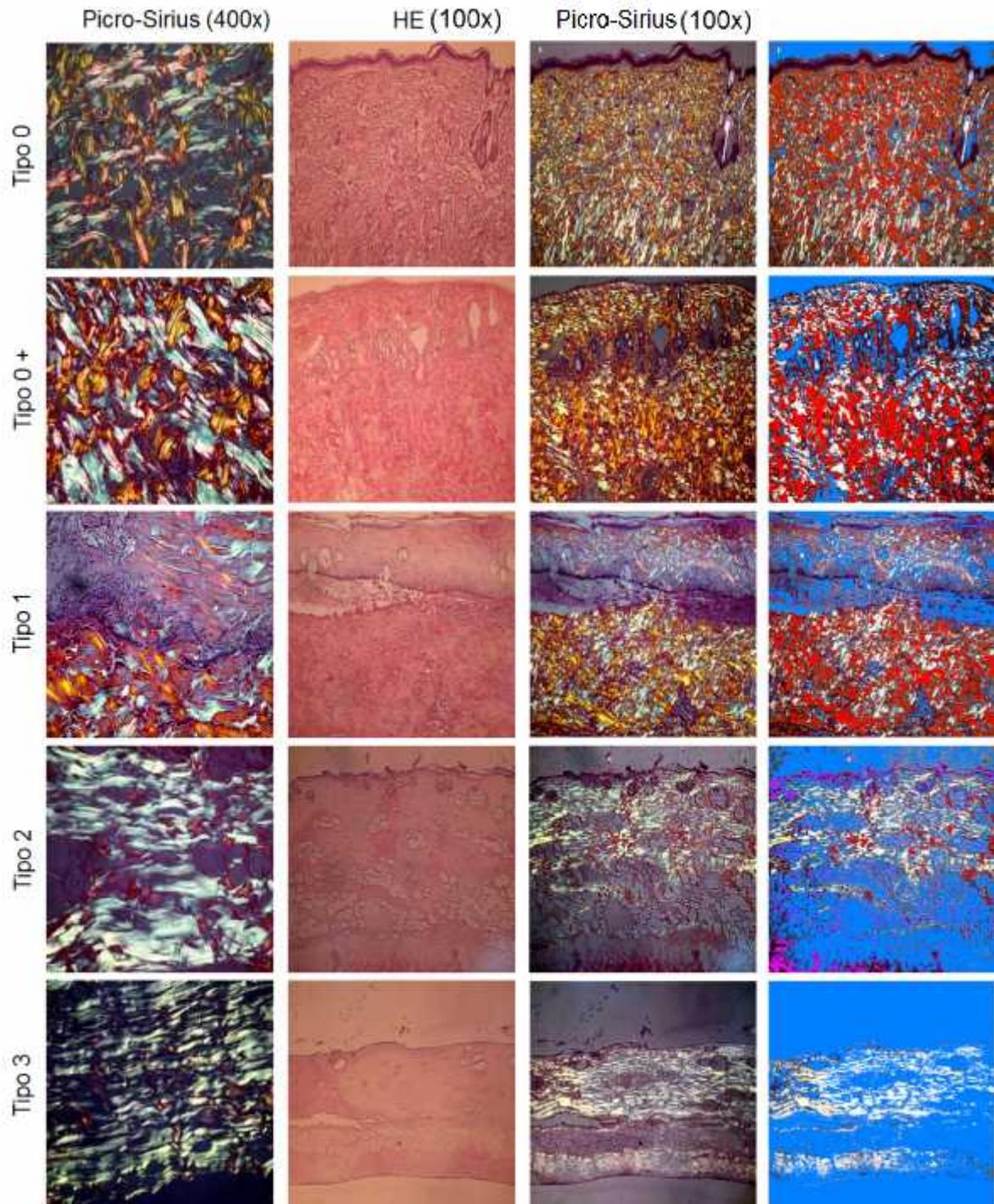


Figura 21:
 Cuantificación de colágeno I y III en los distintos tipos de necrosis. A medida que va progresando la necrosis, se observa un aumento en la proporcionalidad de colágeno tipo III observado como birrefringencia débil en verde claro mediante luz polarizada, asociado a atrofia marcada de la dermis. Hematoxilina y Eosina (HE) y Picro-Sirius con luz polarizada.

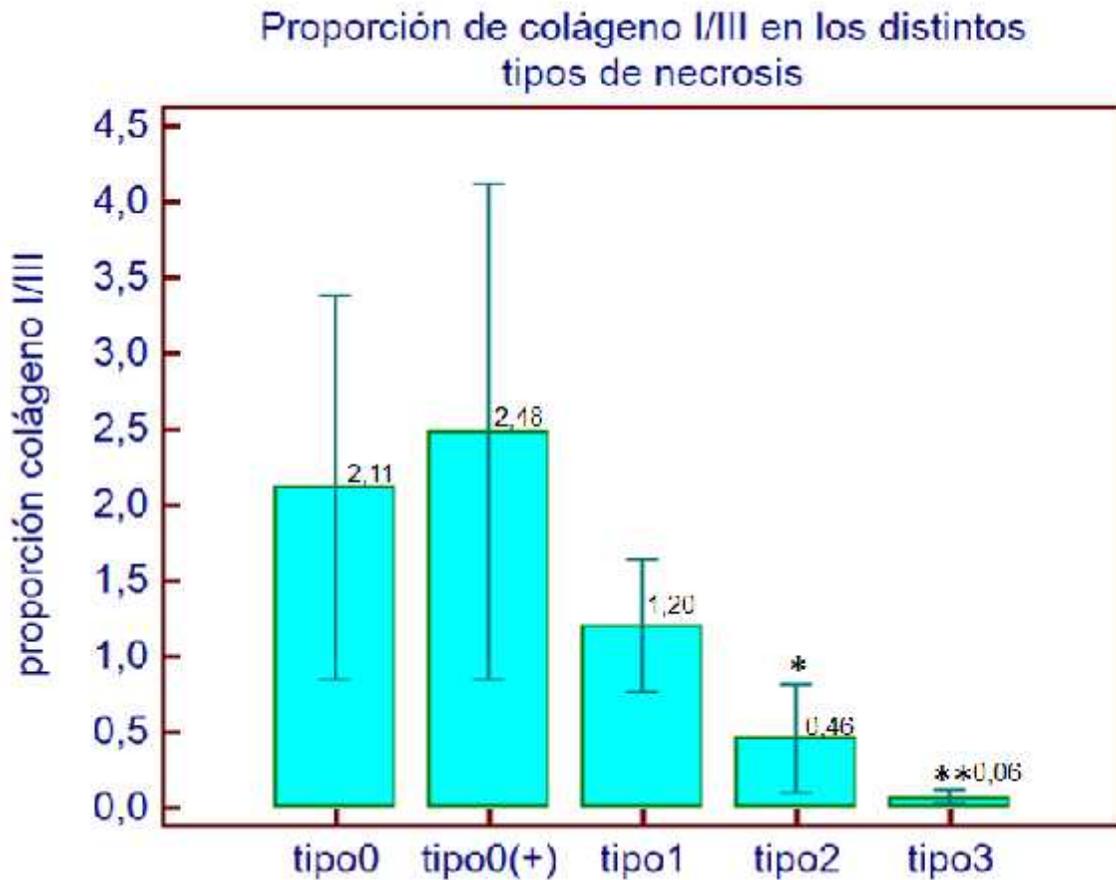


Figura 22:
Evaluación de la proporcionalidad de colágeno I/III en los distintos tipos de necrosis. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$)

Al realizar el análisis de la proporcionalidad de los colágenos I y III, se observa en condiciones normales y en el colgajo con cambios atróficos sin necrosis, un aumento en la proporcionalidad del colágeno I. Se observa una disminución del colágeno I a expensas de un aumento del colágeno III a medida que progresa la necrosis, siendo estadísticamente significativo en los tipo 2 y 3 respecto al tipo 0.

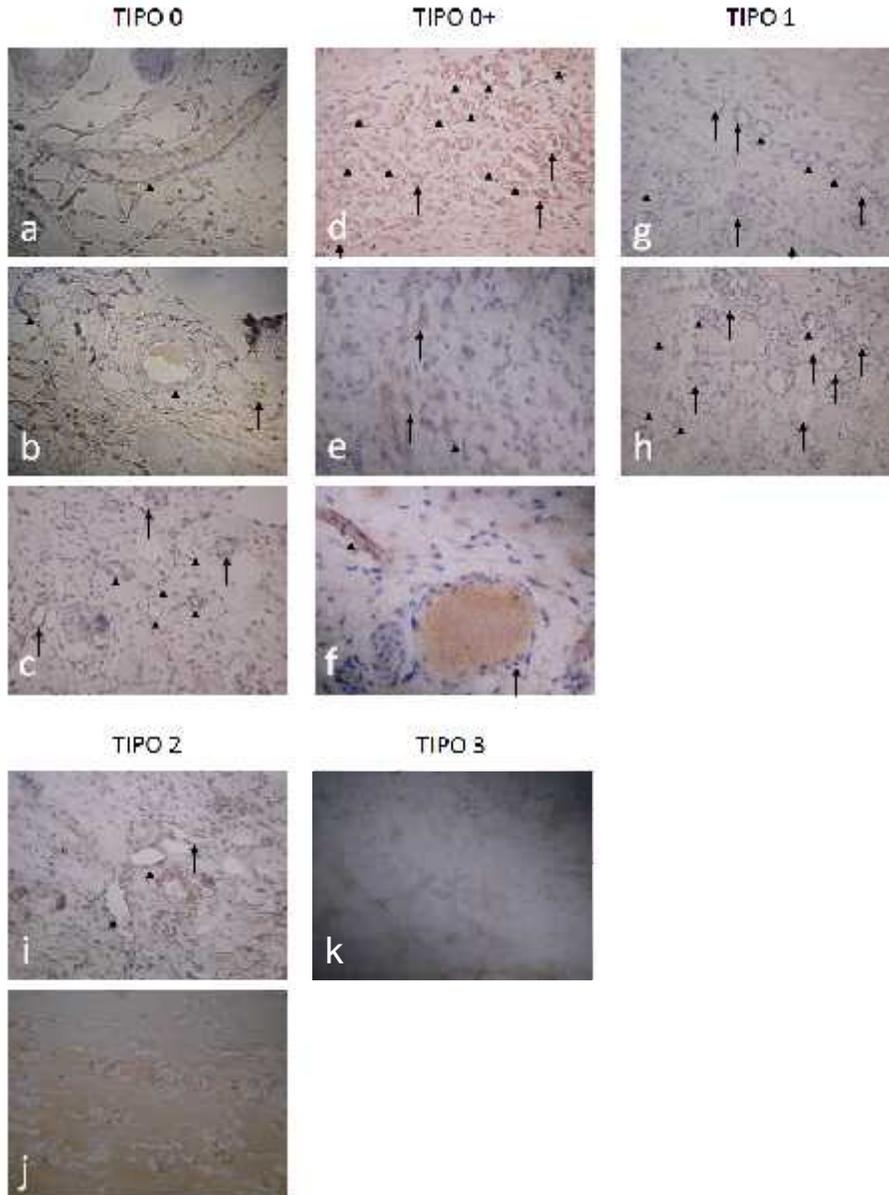


Figura 23:

Cortes histopatológicos de los distintos tipos de necrosis según la clasificación y tinción con VEGF. Se observa en el corte de piel normal (tipo 0), la presencia de vasos sanguíneos maduros (a, b y c). En la muestra de cambio adaptativo reversible (tipo 0+) presenta un aumento de vasos de neoformación en la zona de transición (d), se puede observar en (f) un vaso maduro y uno de neoformación contiguos. En el tipo 1 se observa un aumento de vasos sanguíneos en (g) y (h) bajo la zona de hipereosinofilia y homogenización de la dermis en la superficie. En la necrosis tipo 2 existe una disminución considerable de vasos sanguíneos mientras que en el tipo 3 es prácticamente un territorio avascular (k). Flechas negras indican vasos sanguíneos. Tinción VEGF. Aumento 400X.

Supervivencia y necrosis del colgajo cutáneo random:

Se midió el área de necrosis considerando los tipos del 1 al 3 respectivamente en la totalidad de los grupos. En el grupo control se obtuvo un porcentaje de necrosis en promedio de 45,63% con una desviación estándar de 18,27. En el grupo de retardo del colgajo al quinto día postoperatorio de la primera intervención se pudo constatar que ninguno de los colgajos presentó signos de isquemia ni de necrosis. Luego de la elevación y reposición de éste en el segundo tiempo quirúrgico, al séptimo día postoperatorio se constató un porcentaje de necrosis en promedio de 32,72% con una desviación estándar de 24,75. En el grupo ASCs se administró en promedio $9,95 \times 10^6 \pm 7,3 \times 10^6$ células/mL con 8,80 $\pm 1,81$ días de cultivo, al séptimo día se constató en promedio 28,73% de necrosis con una desviación estándar de 16,31, siendo este valor estadísticamente significativo respecto al grupo control ($p = 0,04$). Por último en el grupo ASCs-H, se administró en promedio $1,5 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$ células/mL con 9,8 $\pm 1,93$ días de cultivo, al séptimo día se constató en promedio 27,99% de necrosis con una desviación estándar de 10,08 ($p = 0,01$) (Figura 24).

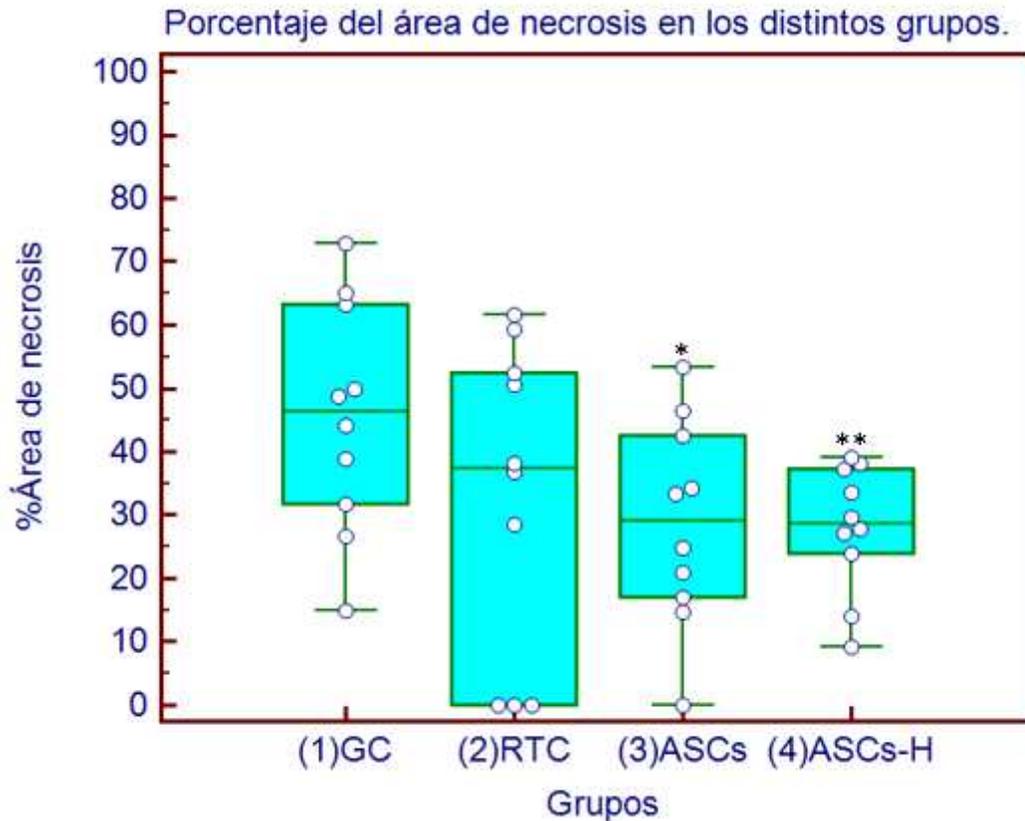


Figura 24:
 Diagrama de caja (Box-Plot) del área de necrosis medido en porcentaje en los distintos grupos intervenidos. GC: grupo control, RTC: retardo del colgajo, ASCs: células madres derivado de tejido adiposo, ASCs-H: células madres derivadas de tejido adiposo adultas preconditionadas con hipoxia. (* = $p < 0,05$, ** = $p = 0,01$)

Tomando en cuenta la puntuación descrita en la clasificación de necrosis, el área de necrosis obtenida se multiplicó según el tipo de necrosis. En la Figura 25 se ilustra cómo se obtuvo el score total tomando en cuenta características macroscópicas mediante inspección y palpación el cual se corroboró con el análisis histopatológico.

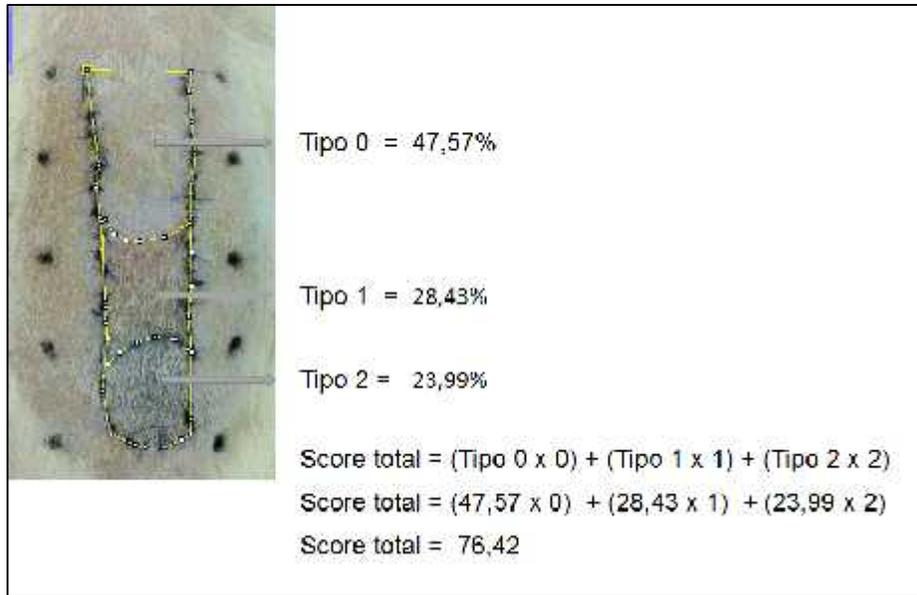


Figura 25:

Se ilustra el método utilizado para la obtención de score de necrosis según los tipos del 0 al 3 descritos en la tabla 1. Ejemplo del score medido en una rata en el grupo de retardo de colgajo.

Se obtuvo un score total en el grupo control de 96,5 +/- 56,93, grupo retardo de colgajo 47,39 +/- 43,88 ($p < 0,05$) respecto al control, grupo ASCs 57,92 +/- 34,66 y por último grupo ASCs-H con un score total de 58,34 +/- 23,86 (Figura 26).

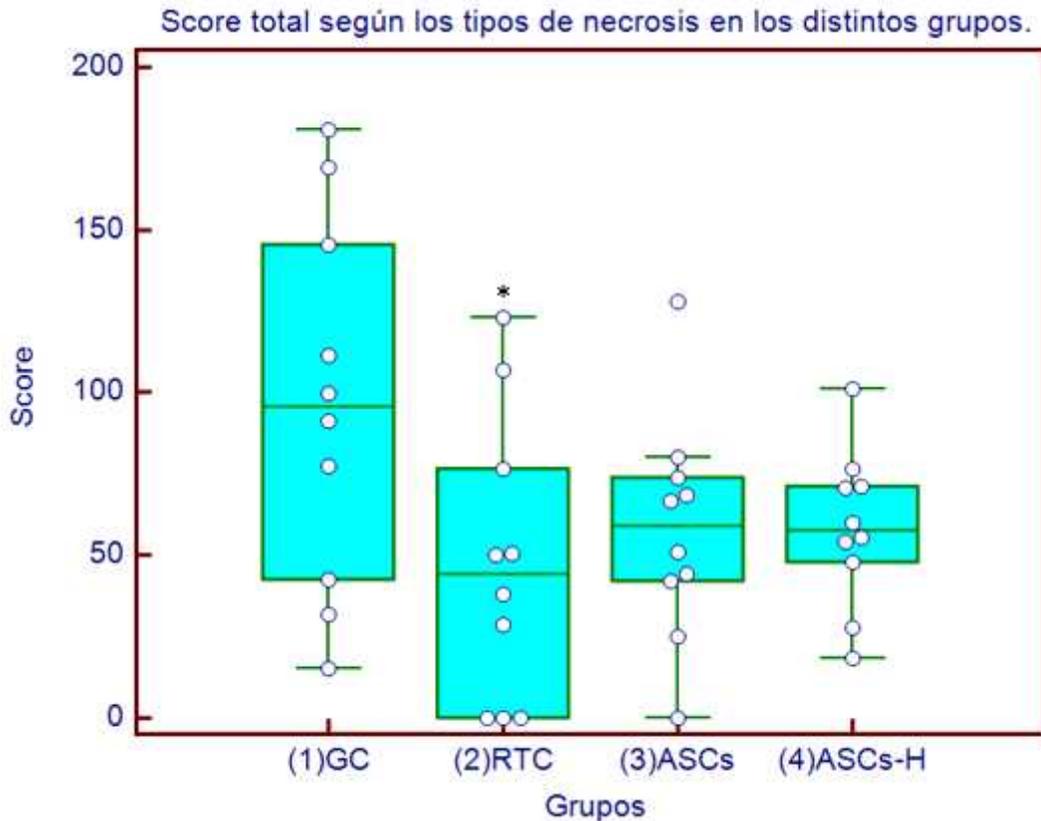


Figura 26:
 Diagrama de caja (Box-Plot) en el cual se analiza el score total según el área y tipo de necrosis en los distintos grupos intervenidos. GC: grupo control, RTC: retardo del colgajo, ASCs: células madres derivado de tejido adiposo, ASCs-H: células madres derivadas de tejido adiposo adultas precondicionadas con hipoxia. (* = $p < 0,05$)

Separando los datos según el tipo de necrosis, se encontró que existe un patrón similar de porcentaje de necrosis en los grupos control y grupos tratadas con células madres, encontrándose un porcentaje mayor de necrosis tipo 2, seguido de necrosis tipo 3 y en menor cuantía necrosis tipo 1. Por otra parte en el grupo de retardo de colgajo, se observó en mayor porcentaje necrosis tipo 1, seguido de necrosis tipo 2, con ausencia de necrosis tipo 3 (Figura 27).

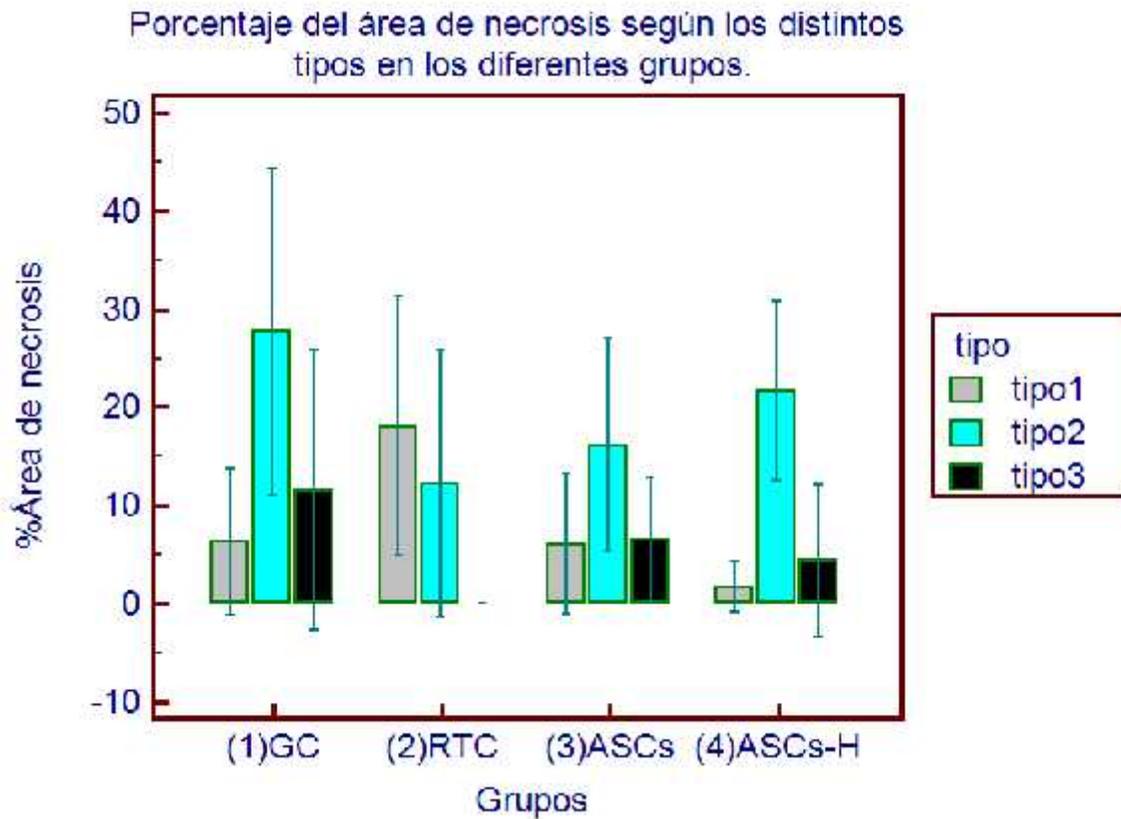


Figura 27:
Se ilustra los porcentajes de los distintos tipos de necrosis en los distintos grupos.

En el grupo de retardo de colgajo, se pudo constatar en algunos casos al séptimo día, reepitelización completa luego de haber presentado necrosis tipo 1 (Figura 28).

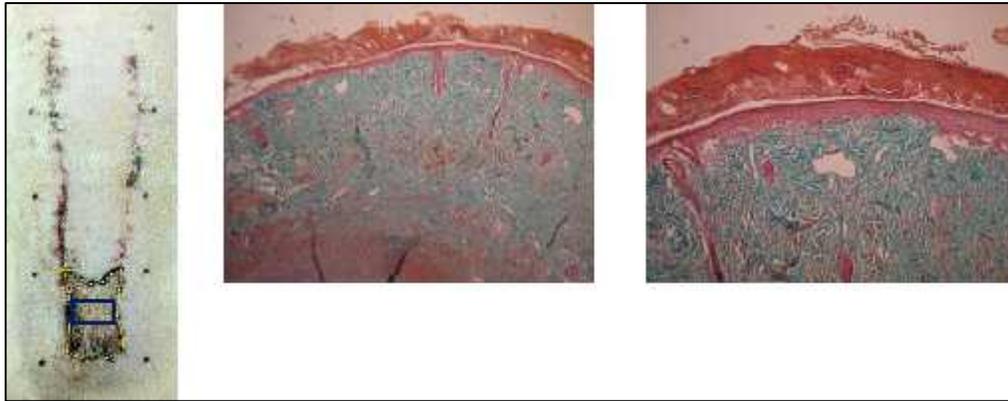


Figura 28:

Imagen a la izquierda de colgajo cutáneo random al séptimo día postoperatorio donde se aprecia zona sugerente de necrosis en su porción distal. Al análisis histopatológico de la zona demarcada con el recuadro, se aprecia reepitelización completa sin atrofia, con desprendimiento de necrosis tipo 1. Tinción Tricrómico de Masson 40x y 100x.

Finalmente se ilustra en la figura 29 se observa la progresión diaria de isquemia y necrosis del colgajo cutáneo random en un rata perteneciente al grupo control y a una rata al cual se administró $1,62 \times 10^7$ células/ml de ASCs-H. En este caso se constata el inicio tardío de lesiones de aspecto necrótico en el grupo intervenido con células madres preconditionadas con hipoxia en comparación a la rata del grupo control.

DISCUSION

En la práctica clínica los colgajos cutáneos se pueden realizar sin inconvenientes cuando su proporción largo y ancho es de 1,5:1 a 2:1. Pero cuando es necesario utilizar colgajos de una extensión mayor, la necrosis distal del colgajo es una de las complicaciones esperables (Wang et al., 2011).

Se han diseñado una gran variabilidad de colgajos cutáneos random en el área dorsal de las ratas. Estos presentan la ventaja de ser un procedimiento quirúrgico de menor complejidad, pero a su vez presentan una gran dispersión de los datos que se pueden corregir aumentando el número de ratas por grupo. Esta dispersión podría reducirse al considerar la realización de un colgajo axial el cual otorga valores más predecibles, ya que presenta una circulación más estable y por ende permitiría realizar una muestra de estudio menor por grupo para la obtención de datos estadísticos (Ohara et al., 2008).

La técnica de retardo de colgajo es uno de los procedimientos más utilizados en cirugía plástica y reconstructiva y con más evidencia existente sobre sus beneficios e interesantemente sobre su superioridad respecto a varias opciones farmacológicas (Barker et al., 1999; Lopez et al., 1995; Kubulus et al., 2004). Aún es controversial el tiempo necesario de espera desde la primera intervención quirúrgica a la elevación del colgajo. Comúnmente se ha utilizado un intervalo que va desde los 7 a 14 días (Lineaweaver et al., 2004). El autor Holzbach et al., (2009), concluyó que el quinto día posterior a la realización del retardo de colgajo, era el tiempo óptimo para ser elevado y transferido, por mostrar mejores resultados de sobrevivencia en comparación a retardos de colgajo de tres y siete días respectivamente, esto explicado por un aumento en la expresión de VEGF y la densidad microvascular. En el presente trabajo se realizaron colgajos con la técnica de retardo de 5 días mostrando una disminución del área de necrosis alrededor de un 13% pero sin diferencia significativa respecto al control. A pesar de ello, fue el grupo que presentó una mayor disminución del score de necrosis en comparación al resto de los grupos tratados. Que se atribuye a una mayor proporción de necrosis tipo 1 respecto a la necrosis tipo 2, con ausencia de necrosis tipo 3. Este dato es

interesante ya que no existe literatura respecto a esta modalidad de clasificación de necrosis. Además precisamente este grupo fue el que presentó mayores casos de ausencia de necrosis al séptimo día, lo cual puede explicarse por la capacidad de reepitelización completa ad integrum de una necrosis tipo 1.

En relación a las células madres, resulta una opción terapéutica promisoriosa para el tratamiento de reparación y regeneración de tejidos. En la actualidad se pueden obtener de distintos tejidos con características similares a las originalmente aisladas de médula ósea. Así es como las células madres derivadas de tejido adiposo adultas cobran importancia, ya que se encuentran en forma abundante, es de fácil acceso y es posible lograr diferenciación celular de distintos linajes mesodérmicos como lo es el tejido adiposo, osteogénico, condrogénico y miogénico (Mizuno. 2009). Además, es posible lograr inducción para la expresión de marcadores ectodérmicos para la producción de neuronas, por lo tanto ya se podrían considerar estas células con capacidad pluripotencial (Zuk, 2013). En este trabajo se logró obtener células madres derivadas de tejido adiposo adultas de la zona inguino-abdominal de ratas. Para poder caracterizar y garantizar que corresponden a células madres, éstas presentan características morfológicas que recuerdan a los fibroblastos, poseen capacidad de adherirse al plástico y presentan expresión de marcadores de superficie celular como lo es el CD90 en una proporción mayor al 90% (Dominici et al., 2006; Rebelatto et al., 2008; Kern et al., 2006) y expresión de vimentina que corresponde a filamentos intermedios del citoesqueleto que se encuentra particularmente en células indiferenciadas (Nikoli et al., 2011; Lama et al., 2007).

Uno de los mayores problemas del tratamiento con células madres, es que una gran proporción de estas células mueren en el sitio trasplantado isquémico, situación que podría reducir su eficacia (Wang et al., 2011). Es por ello que se optó por potenciar estas células en hipoxia al (2% O₂ y 5% CO₂). Las células madres precondicionadas con hipoxia aumentarían la resistencia a las injurias a través de la expresión de señales protectoras tales como el factor inducible a hipoxia (HIF - 1). La expresión de este factor de transcripción contribuiría a la activación de genes proangiogénicos, genes promotores de la migración celular, genes antioxidantes y

protectores de la apoptosis con mayor tolerancia al trasplante en zonas isquémicas (Salceda & Caro, 1997).

Dentro de las propiedades de las células madres preconditionadas con hipoxia, se pudo constatar un aumento significativo de la proliferación celular, así como su capacidad migratoria respecto a las células sin preconditionamiento. El aumento de la capacidad migratoria se podría explicar por una regulación al alza de proteínas involucradas en la movilidad celular (Yu et al., 2013), así como la expresión de receptores quimiotácticos CXCR4, CXCR7, y CX3CR1 que desempeñarían un rol importante para el reclutamiento de células madres hacia el tejido dañado y su asentamiento (Haque et al., 2013). La capacidad de auto renovación de las células madres es una de sus características claves, por lo tanto un aumento de la tasa de proliferación es necesaria para su eficiencia en la terapia regenerativa (Haque et al., 2013). Las células madres sometidas a una concentración de oxígeno entre de 2 a 5%, mejorarían la capacidad proliferativa por medio de la expresión del HIF 1alfa, y aumento de la expresión de NANOG, el cual es un regulador de la entrada de la fase S del ciclo celular (Forristal et al., 2010).

Se pudo corroborar un aumento de la proliferación celular ya a las 24 horas de exposición a hipoxia celular (Forristal et al., 2010) utilizando un medio de cultivo que estuvo sometido a hipoxia 24 horas previas.

Estas células se administraron a nivel subcutáneo inmediatamente luego de la reposición del colgajo. Se observó una disminución significativa del área de necrosis en los grupos ASCs y ASCs-H (28,73% +/- 16,31 y 27,99% +/- 10,08 respectivamente) respecto al grupo control, sin diferencia estadística entre ellas, por lo tanto serían superiores al método de retardo de colgajo de cinco días. Estos datos son distintos a los publicados por Wang et al., (2011), en el cual se realizó el mismo diseño de colgajo para la administración subcutánea de ASCs y ASCs-H (1% O₂ y 5%CO₂) a concentraciones de 4×10^6 . Obteniendo un porcentaje de área de necrosis en el control de 75,5%, ASCs 54,3% y ASCs-H 35,6%, presentando en estos dos últimos grupos diferencia significativa. Cabe destacar que en el presente trabajo se

administró el doble de células en el grupo ASCs, lo cual podría explicar su menor porcentaje de necrosis. Pero no explicaría la similitud en los resultados en relación al ASCs-H.

Por otra parte en ambos grupos tratados con células madres, no hubo diferencias de proporcionalidad de los tipos de necrosis respecto al control, presentando mayor proporción de necrosis tipo 2 seguido de necrosis tipo 3, contrario a lo encontrado en el grupo de retardo de colgajo con un aumento significativo de necrosis tipo 1 y con ausencia de necrosis tipo 3.

Las células madres derivadas de tejido adiposo ya se han utilizado para el tratamiento de una gran variedad de patologías quirúrgicas en humanos y existe literatura al respecto para problemas como cicatrices por radiación, fracturas, fístulas, trasplantes, entre otros (Meruane y Rojas. 2011). Pero existe escasa literatura sobre las posibles mejoras respecto al resultado de estos tratamientos utilizando células precondicionadas. Por ejemplo, uno de los tratamientos promisorios para lipoatrofia facial secundario al síndrome de Parry-Romberg, es la lipoinyección de tejido graso autólogo para moldear el contorno facial (Yoshimura et al., 2008). Este sería superior al tratamiento estándar de realizar microcirugía para la reconstrucción mediante un colgajo libre, tanto por su complejidad como por las cicatrices secundarias inherentes al tratamiento, si no fuera por el bajo porcentaje de sobrevida del injerto graso y necrosis grasa asociado con involución importante del volumen inyectado inicialmente. Es por ello que una de las nuevas estrategias que se están empleando, es la administración de células madres derivado de tejido adiposo al mismo tejido graso que será inyectado. Este procedimiento adicional en el mismo acto quirúrgico según Yoshimura, aumentaría la viabilidad del injerto graso en comparación al método tradicional. A pesar de ello existe una disminución del volumen en los dos primeros meses post quirúrgico en ambos grupos, solamente que parece continuar su descenso en el grupo sin células madres, mientras que en el grupo con células madre su disminución es menor (Yoshimura et al., 2008) Este mismo procedimiento se está aplicando para la mamoplastía de aumento (Yoshimura et al., 2008). A pesar de estos datos promisorios iniciales, se podría

estudiar la eficacia de este tratamiento utilizando células madres precondicionadas con hipoxia, evaluando el rango de volumen inicial inyectado versus volumen final.

La realización de un score de necrosis no constituía uno de los objetivos del trabajo. Tampoco existe literatura al respecto. Sin embargo, a través del análisis histológico en distintas zonas de los colgajos, fue posible identificar distintas etapas de necrosis que se pudieron correlacionar con aspectos al examen físico de tonalidad, consistencia y elasticidad del colgajo. Estos cambios van desde un cambio adaptativo reversible que se caracteriza por atrofia del epitelio y de las glándulas sebáceas, sin encontrar modificación a nivel de tejido conectivo, luego a evolucionar a una necrosis parcial de la dermis con infiltrado inflamatorio superficial, seguido de necrosis y atrofia completa de la dermis con infiltrado inflamatorio superficial y profundo. Por último, una necrosis avanzada en la cual el espesor de la dermis está considerablemente disminuido y al examen físico es de consistencia acartonada.

En la piel normal se reconocen 2 tipos de colágeno predominantes: el tipo I de fibras gruesas y organizadas de gran fuerza tensil y resistencia elástica y el tipo III de fibras delgadas y no organizadas en menor cantidad que el tipo I (Borquez et al., 2005). La proporción de colágeno tipo I/III en adulto en el trabajo de Cheng et al., (2011) es de 2,46 +/- 0,15, similar a lo encontrado en piel de colgajo sin necrosis y con cambio adaptativo reversible, 2,11 +/- 2,78 y 2,48 +/- 2,13 respectivamente. Esta proporción cambia especialmente durante la fase temprana de cicatrización de heridas, debido a que los fibroblastos activamente comienzan a producir colágeno tipo III. Ya para la segunda semana, el colágeno tipo I nuevamente comienza a ser producido principalmente por los fibroblastos. (Ponrasu & Suguna, 2012). Existe una correlación directa entre aumento del grado de necrosis y disminución del colágeno I a expensas de un aumento del colágeno III asociado a una disminución progresiva de vasos sanguíneos hasta el grado máximo de necrosis en el cual prácticamente es un territorio avascular en la dermis. La capacidad de reepitelización ad integrum en la necrosis tipo 1 en el colgajo cutáneo random al séptimo día, se podría explicar ya que bajo el territorio de inflamación superficial y de la homogenización e

hipereosinofilia del colágeno, la dermis no presenta alteración en el colágeno ni en su proporción, además presenta un aumento de vasos sanguíneos inmediatamente bajo la zona necrótica, por lo tanto la reepitelización en este caso sería más rápida en comparación a la necrosis tipo 2 en el cual se compromete todo el espesor de la dermis, presenta disminución considerable de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatorio en la dermis, encontrándose mayormente en la hipodermis.

Esta clasificación parece ser un método adecuado para entender la evolución de necrosis del colgajo cutáneo y como método complementario para analizar la efectividad de distintos tratamientos ya que considera los aspectos histopatológicos además del área de necrosis.

Este estudio demuestra un aumento de la capacidad migratoria y proliferativa de las células madres precondicionadas con hipoxia en comparación a las sin precondicionamiento. Finalmente no se acepta la hipótesis de este estudio, las ASCs y en mayor medida las ASCs-H disminuyen significativamente el área de necrosis del colgajo cutáneo random, pero sin encontrar diferencia estadística entre ellas. La técnica de retardo de colgajo de cinco días, a pesar de no presentar disminución en el área de necrosis, muestra un colgajo de menor grado de necrosis al séptimo día con mayor capacidad de reepitelización respecto al resto de los grupos. Estos hallazgos permiten un enfoque distinto frente al colgajo de retardo en la práctica clínica ya que utilizando la clasificación de necrosis permite optar por un enfrentamiento más conservador y de expectación al estar frente a una necrosis de menor grado (tipo 1). La administración de estas células en colgajos cutáneos random en humanos podría corresponder a una opción terapéutica para disminuir el área de necrosis, pero estos al ser predominantemente de mayor grado (tipo 2 y 3), no poseen capacidad de reepitelización temprana, sino por el contrario, requeriría en esta zona ser manejada mediante desbridamientos, curaciones para cierre por segunda intención, colgajos o injertos. Finalmente, la clasificación de necrosis de colgajo cutáneo random podría ser utilizada por otros autores para estudios futuros.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Adamson JE, Horton CE, Crawford HH, Ayers WT Jr. Studies on the action of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap. *Plast. Reconstr. Surg.* 39:142, 1967.
- 2 Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 3(1):1-15, 2002.
- 3 Andrades P, Sepúlveda S. Injertos. *Cirugía plástica esencial*. Ed. Universidad de Chile. 1° Edición. Capítulo 5, pg 62-8210, 2005.
- 4 Bagdas D, Cam Etoz B, Inan Ozturkoglu S, Cinkilic N, Ozyigit MO, Gul Z, Isbil Buyukcoskun N, Ozluk K, Gurun MS. Effects of systemic chlorogenic acid on random-pattern dorsal skin flap survival in diabetic rats. *Biol Pharm Bull.* 37(3):361-70, 2014.
- 5 Baker SR, Swanson NA. *Local flaps in facial reconstruction*. St. Louis: Mosby, 1995.
- 6 Barker JH, Frank J, Bidiwala SB, Stengel CK, Carroll SM, Carroll CM, van Aalst V, Anderson GL. An animal model to study microcirculatory changes associated with vascular delay. *Br J Plast Surg.* 52(2):133-42, 1999.
- 7 Böhm F, Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 1;76(1):8-18, 2007.
- 8 Borquez P. Estudio inmunohistoquímico del colágeno tipo II y tipo III en la piel de pacientes con hernia inguinal primaria. *Rev Chil Cir;* 57: 489-494, 2005.
- 9 Cheng W, Yan-Hua R, Fang-Gang N, Guo-An Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *African Journal of Biotechnology.* 10(13): 2524-2529, 2011.

- 10 Chung KI, Kim HK, Kim WS, Bae TH. The effects of polydeoxyribonucleotide on the survival of random pattern skin flaps in rats. *Arch Plast Surg.* 40(3):181-6, 2013.
- 11 da Rocha FP, Fagundes DJ, Pires JA, da Rocha FS. Effects of hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine in survival of random pattern skin flaps in rats. *Indian J Plast Surg.* 45(3):453-8, 2012.
- 12 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 8(4):315-7, 2006.
- 13 Estevão LR, Medeiros JP, Baratella-Evêncio L, Simões RS, Mendonça Fde S, Evêncio-Neto J. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. *Acta Cir Bras.* 28(12):863-9, 2013.
- 14 Félétou M, Vanhoutte PM, Verbeuren TJ. The thromboxane/endoperoxide receptor (TP): the common villain. *J Cardiovasc Pharmacol.* 55(4):317-32, 2010.
- 15 Folco G, Murphy RC. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol Rev.* 58(3):375-88, 2006.
- 16 Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction.* 139(1):85-97, 2010.
- 17 Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3(4):393-403, 1970.
- 18 Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 294:1871–1875, 2001.

- 19 García M, Pereira R, Flores S. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed.* 17(3):190-7, 1998.
- 20 Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 11;100(9):1249-60, 2007.
- 21 Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Brill T, Busch R, Gansbacher B, Biemer E. Prediction of flap necrosis with laser induced indocyanine green fluorescence in a rat model. *Br J Plast Surg.* 58(5):695-701, 2005
- 22 Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Biemer E, Gansbacher B. AdVEGF165 gene transfer increases survival in overdimensioned skin flaps. *J Gene Med.* 7(3):297-306, 2005.
- 23 Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 255(6 Pt 2):H1269-75, 1988.
- 24 Gurunluoglu R, Meirer R, Shafighi M, Huemer GM, Yilmaz B, Piza-Katzer H. Gene therapy with adenovirus-mediated VEGF enhances skin flap prefabrication. *Microsurgery,* 25(5):433-41, 2005.
- 25 Hammond DC, Brooksher RD, Mann RJ, Beernink JH. The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival. *Plast Reconstr Surg.* 91(2):316-21, 1993.
- 26 Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *ScientificWorldJournal.* 2013:1-12, 2013.
- 27 Holzbach T, Neshkova I, Vlaskou D, Konerding MA, Gansbacher B, Biemer E, Giunta RE. Searching for the right timing of surgical delay: angiogenesis, vascular endothelial growth factor and perfusion changes in a skin-flap model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.,* 62(11):1534-42, 2009.

- 28 Honrado CP, Murakami CS. Wound healing and physiology of skin flaps. *Facial Plast Surg Clin North Am.*13(2):203-14, 2005.
- 29 Iyú D, Jüttner M, Glenn JR, White AE, Johnson AJ, Fox SC, Heptinstall S. PGE1 and PGE2 modify platelet function through different prostanoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 94(1-2):9-16, 2011.
- 30 Jung H, Gurunluoglu R, Scharpf J, Siemionow M. Adenovirus-mediated angiopoietin-1 gene therapy enhances skin flap survival. *Microsurgery.* 23(4):374-80, 2003.
- 31 Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandieh-doulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Milligen FJ. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.*, 332(3):415-26, 2008.
- 32 Kamath VV, Satelur K, Komali Y, Krishnamurthy SS. Image analyses of collagen types and thickness in oral sub mucous fibrosis stained with picrosirius red under polarizing microscope. *J Orofac Sci.*5:123-7,2013.
- 33 Katz AJ, Lull R, Hedrick MH, Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg.*, 26(4):587-603, 1999.
- 34 Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in Vascular Diseases. *Circ J.* 74:836–843, 2010.
- 35 Kayser MR: Surgical flaps. *Selected Readings in Plastic Surgery.* 9(2):1-63, 1999.
- 36 Kelly CP, Gupta A, Keskin M, Jackson IT. A new design of a dorsal flap in the rat to study skin necrosis and its prevention. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 63(9):1553-6, 2010.
- 37 Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294–1301, 2006.

- 38 Kiumehr S, Demehri S, Rabbani S, Amanpour S, Mohagheghi MA, Dehpour AR. Preconditioning of the rat random-pattern skin flap: modulation by opioids. *Br J Plast Surg.* 58(1):58-64, 2005.
- 39 Kosko JR, Williams PB, Pratt MF. Correlation of neutrophil activation and skin flap survival in pharmacologically altered pigs. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 106(9):790-4, 1997.
- 40 Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg.* 53(3):234-9, 2000.
- 41 Kubulus D, Roesken F, Amon M, Rucker M, Bauer M, Bauer I, Menger MD. Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(5):H2332-40, 2004.
- 42 Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei AC, Murray S, Wang Z, Liao H, Toews GB, Krebsbach PH, Peters-Golden M, Pinsky DJ, Martinez FJ, Thannickal VJ. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest.* 117(4):989-96, 2007.
- 43 Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen.*, 17(4):540-7, 2009.
- 44 Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg.*, 239(6):866-73, 2004.
- 45 Lopez JL, Nieto CS, Garcia PB, Orteja JM. Evaluation of angiogenesis in delayed skin flaps using a monoclonal antibody for the vascular endothelium. *BR J Plast Surg.* 48:479, 1995.

- 46 Mahfoudh-Boussaid A1, Zaouali MA, Hadj-Ayed K, Miled AH, Saidane-Mosbahi D, Rosello-Catafau J, Ben Abdennebi H. Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1 alpha in ischemic kidney: the role of nitric oxide. *J Biomed Sci.* 19: 7, 2012.
- 47 McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast. Reconstr. Surg.* 35: 177, 1965.
- 48 McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *Br J Plast Surg.* 26: 202-213, 1973.
- 49 Meruane M, Rojas M. Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo. *Int. J. Morphol.* 28(3):879-889, 2010.
- 50 Meruane M, Rojas M. Células troncales derivadas del tejido adiposo: Técnica de obtención y utilidad en cirugía. *Rev Chil Cir.* 63(2):223-228, 2011.
- 51 Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nihon Med Sch.* 76(2):56-66, 2009.
- 52 Mobley SR, Glassberg MK, Luebke A, Perlyn CA, Davis RE. Expression of endothelin 1 in rat random-pattern skin flaps treated with topical nifedipine. *Arch Facial Plast Surg.* 5(1):78-82, 2003.
- 53 Montes GS, Junqueira LC. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 86(3):1-11, 1991.
- 54 Murphy RC, Lawrence WT, Robson MC, Heggors JP. Surgical delay and arachidonic acid metabolites: evidence for an inflammatory mechanism: an experimental study in rats. *Br J Plast Surg.* 38(2):272-7, 1985.
- 55 Myers MB, Cherry G. Augmentation of tissue survival by delay: an experimental study in rabbits. *Plast Reconstr Surg.* 39: 397-401, 1967.

- 56 Nezami BG, Rahimpour S, Sadeghi M, Sianati S, Anaraki DK, Ebrahimi F, Ghasemi M, Dehpour AR. Chronic lithium impairs skin tolerance to ischemia in random-pattern skin flap of rats. *J Surg Res.* 171(1):374-8, 2011.
- 57 Nikoli N., Krsti A., Trivanovi D, Mojsilovi S, Koci J, Santibanez JF, Jov i G, Bugarski D. Mesenchymal stem cell properties of dental pulp cells from deciduous teeth. *Arch. Biol. Sci.* 63(4): 933-942, 2011.
- 58 Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, Ifuku M, Kosai Y, Wang B, Nolte C, Aoki S, Kettenmann H, Wada K. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *J Neurochem.* 101:397–410, 2007.
- 59 Ohara H, Kishi K, Nakajima T. Rat dorsal paired island skin flaps: a precise model for flap survival evaluation. *Keio J Med.* 57(4): 211-6, 2008.
- 60 Patel K, Sykes J. Concepts in local flap design and classification. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 22(1): 13-23, 2011.
- 61 Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol Vis.* 14:431-42, 2008.
- 62 Ponrasu T, Suguna L. Efficacy of *Annona squamosa* on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Wound Journal.* 9(6): 613-623, 2012.
- 63 Prasad M, Zachar V, Fink T, Pennisi CP. Moderate hypoxia influences potassium outward currents in adipose-derived stem cells. *PLoS One.* 9(8):e104912, 2014.
- 64 Rahimpour S, Nezami BG, Karimian N, Sotoudeh-Anvari M, Ebrahimi F, Taleb S, Mirazi N, Dehpour AR. Hypothyroidism improves random-pattern skin flap survival in rats. *J Surg Res.* 178(1):524-8, 2012.

- 65 Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)*. 233(7):901-13, 2008.
- 66 Rees R, Smith D, Li TD, Cashmer B, Garner W, Punch J, Smith DJ Jr. The role of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase in skin ischemia. *J Surg Res*. 56(2):162-7, 1994.
- 67 Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31(5):986-1000, 2011.
- 68 Robbins, Cotran. *Patología estructural y funcional*. Ed. Elsevier, 8ª ed., Capítulo 1, pg 3-42, 2010.
- 69 Romanque P, Uribe M, Videla L. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusión hepática y en el preacondicionamiento isquémico. *Rev Méd Chile*. 133: 469-476, 2005.
- 70 Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 5;272(36):22642-7, 1997.
- 71 Santander B, García M, Aliaga A. Colgajo torácico a distancia para la reconstrucción de un segmento de la mano. *Cuad. - Hosp. Clín*. 52(1): 90-92, 2007.
- 72 Sorolla JP, Obaíd M, Ibarra C, Arbulo D, Bautista A, Wisnea P, Cabello R, Fontbona M. Expansores tisulares en reconstrucción de defectos craneofaciales. Estudio multicéntrico retrospectivo. *Cir.plást. iberolatinoam*. 40(4): 417-423, 2014.

- 73 Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci.* 117(5):667-75, 2004.
- 74 Suzuki S, Isshiki N, Ogawa Y, Nishimura R, Kurokawa M. Effect of intravenous prostaglandin E1 on experimental flaps. *Ann Plast Surg.* 19(1): 49-53, 1987.
- 75 Taleb S, Moghaddas P, Rahimi Balaei M, Taleb S, Rahimpour S, Abbasi A, Ejtemaei-Mehr S, Dehpour AR. Metformin improves skin flap survival through nitric oxide system. *J Surg Res.* pii: S0022-4804(14)00649-0, 2014.
- 76 Tatlidede S, McCormack MC, Eberlin KR, et al. A novel murine island skin flap for ischemic preconditioning. *J Surg Res.* 154(1):112-7, 2009.
- 77 Tatlidede S, McCormack MC, Eberlin KR, Nguyen JT, Randolph MA, Austen WG Jr. Pre- and/or postsurgical administration of estradiol benzoate increases skin flap viability in female rats. *Aesthetic Plast Surg.* 37(5):1003-9, 2013.
- 78 Wang JC, Xia L, Song XB, Wang CE, Wei FC. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells improves survival of ultra-long random skin flap. *Chin Med J (Engl).* 124(16):2507-11, 2011.
- 79 Ohara H, Kishi K, Nakajima T. Rat dorsal paired island skin flaps: a precise model for flap survival evaluation. *Keio J Med.* 57(4):211-6, 2008.
- 80 Wei L, Fraser JL, Lu ZY, Hu X, Yu SP. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis.* 46:635-645, 2012.
- 81 Yang M, Sheng L, Li H, Weng R, Li QF. Improvement of the skin flap survival with the bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in a rat model. *Microsurgery.* 30(4):275-81, 2010.

- 82 Yang S, Pilgaard L, Chase LG, Boucher S, Vemuri MC, Fink T, Zachar V. Defined xenogeneic-free and hypoxic environment provides superior conditions for long-term expansion of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 18(8):593-602, 2012.
- 83 Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*. 32(1):48-55, 2008.
- 84 Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg*. 34(9):1178-85, 2008.
- 85 Yu SP, Wei Z, Wei L. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Transl Stroke Res*. 4(1):76-88, 2013.
- 86 Zhang F, Richards L, Angel MF, Zhang J, Liu H, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. *Br J Plast Surg*. 55(1):59-63, 2002.
- 87 Zuk PA. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells*. 1-35, 2013.