

Concentración de Factor de Crecimiento Transformante Beta 1 obtenido con dos métodos distintos de centrifugación en plasma de perros.

Concentration of Growth Factor Beta 1 obtained with two different centrifugation methods in plasma of dogs.

Christof Fischer¹ MV, DVM; Ignacio Troncoso¹ MV; Álvaro Luzio¹ MV, MSc; Álvaro Opazo¹ MV, DVM; Carolina Rios² MV, MSc; Mitzi Cherres³ MV; Jean Claude Ionita⁴ MV, DVM.

Recibido: 25 Septiembre 2014
Aceptado: 20 Noviembre 2014

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la concentración de factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) en el plasma de 15 perros, utilizando dos métodos iniciales distintos de centrifugación, con el fin de determinar con qué método se puede obtener mayor concentración de TGF- β 1. En una primera instancia, la sangre obtenida fue centrifugada por separado con 2 procesos distintos de centrifugación (Grupo 1: 1500 rpm por 5 minutos (RCF 1292). Grupo 2: 3500 rpm por 5 minutos (RCF 1583)); posteriormente, los plasmas obtenidos de las 2 centrifugaciones fueron centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos (RCF 1292) para finalmente determinar y comparar la concentración de TGF- β 1 obtenidas con ambos métodos de centrifugación. La concentración de TGF- β 1 se realizó con el test de ensayo inmunoenzimático ELISA^e. Las concentraciones de TGF- β 1 fueron significativamente mayores utilizando el primer proceso de centrifugación (19,45 pg/ml) al compararlo con el segundo (12,39 pg/ml). Según el conocimiento de los autores, este es el primer estudio en perros que compara 2 métodos de centrifugación para la obtención de TGF- β 1 y queda demostrado que dicho proceso puede ser un factor relevante a considerar en la obtención de TGF- β 1 en perros.

Palabras clave: factor de crecimiento β 1, perro, método de centrifugación.

Abstract

The aim of the present study was to determine the concentration of growth factor β 1 (TGF- β 1) in plasma samples from 15 dogs. Two different centrifugation methods were performed, in order to determine which method concentrates more TGF- β 1. In the first part of the study, every blood samples were centrifuged with two different centrifugation methods (Group 1: 1500 rpm with a run time of 5 min (RCF 1292). Group 2: 3500 rpm with a run time of 5 min (RCF 1583)). Afterwards, The obtained plasmas were centrifuged a second time at 1500 rpm with a run time of 5 min (RCF 1292) to finally determine and compare TGF- β 1 concentrations with the two centrifugation methods. The concentrations of TGF- β 1 were assayed by use of an ELISA^e. The concentrations of TGF- β 1 with the first centrifugation method (19, 45 pg/ml) were significantly higher than the second centrifugation method (12, 39 pg/ml). To the author's knowledge, this is the first report, which evaluates TGF- β 1 concentration with two different centrifugation processes. According to these results, the centrifugation is a relevant factor to consider when obtaining TGF- β 1 in dogs.

Key words: growth factor β 1, dog, centrifugation method.

Introducción

En los últimos años, han ganado importancia, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, nuevas estrategias de tratamiento para diversas patologías, tales como el uso de células madres y plasma rico en plaquetas (PRP).^{1, 2, 3, 4, 5} Básicamente, el PRP se puede definir como un

sustrato que contiene una mayor concentración de plaquetas.⁶ Las plaquetas contienen varios factores de crecimiento (FC), como el FC transformante beta 1 (TGF- β 1), el FC insulínico tipo I (IGF-I), el FC derivado de plaquetas (PDGF) y otras moléculas que modulan la respuesta inflamatoria y la regeneración tisular.⁷ Por lo tanto, todo sustrato

¹. Universidad Santo Tomás. Escuela de Medicina Veterinaria. Sede Concepción. Chile. cfischer@santotomas.cl

². Universidad Santo Tomás, Sede Los Ángeles. Chile.

³. Centro Veterinario Alemán Kleintierklinik, San Pedro de la Paz. Chile.

⁴. Large Animal Clinic for Surgery, University of Leipzig, Leipzig. Germany.

que contenga una concentración alta de plaquetas puede considerarse como un sustrato rico en factores de crecimiento.⁸ Dentro de los factores de crecimiento, el TGF- β 1 posee una relevancia en traumatología y ortopedia encontrándose en muchos tejidos, pero su localización más importante y abundante es en las plaquetas, en las células mesenquimales pluripotenciales, osteoblastos, condrocitos y en callo óseo de fracturas.⁹ El TGF- β 1 regula la expresión de colágenos y fibronectina, restringe la degradación de la matriz extracelular, disminuye la expresión de las metaloproteinasas de matriz y promueve la síntesis de su inhibidor tisular y del factor de crecimiento de fibroblastos y la producción de angiogénesis.^{10, 11, 12} Este factor se encuentra en el hematoma de fracturas en las primeras 24 horas tras el traumatismo. El efecto de estimular la síntesis proteica en condrocitos y osteoblastos *in vitro*, su elevada concentración en la matriz ósea extracelular y la liberación por parte de las plaquetas en el hematoma de la fractura, hacen pensar que el TGF- β 1 es un factor de crecimiento importante implicado en la regulación de la formación ósea y cartilaginosa tras una lesión, además de tener un rol importante en el crecimiento normal y la remodelación tisular.⁹

En medicina humana, existen recomendaciones sobre el número de plaquetas necesario para realzar potencialmente la cicatrización,⁶ y existen estudios en personas que comprueban que los síntomas clínicos asociados a osteoartritis (OA) disminuyen tras aplicaciones intraarticulares de PRP, sugiriéndose así que las terapias con PRP pueden ser una alternativa potencial para el tratamiento en pacientes con OA.^{13, 14, 15} En medicina veterinaria, falta evidencia similar para el tratamiento de OA en pacientes caninos, pero se ha demostrado que el TGF- β 1 estimula el crecimiento óseo en perros¹⁶ y se han obtenido resultados favorables en equinos tratados con PRP, sugiriéndose así, que similares resultados pueden ser beneficiosos también en caninos.^{2, 17}

El enriquecimiento de plaquetas en medicina humana se encuentra establecido y es el resultado de dos centrifugaciones. Una primera centrifugación, que separa las células rojas del plasma, que contiene las plaquetas. Una segunda centrifugación, que finalmente separa las plaquetas en conjunto con las células blancas del plasma.⁶ En el caso de los equinos, se ha demostrado, que distintas centrifugaciones tienen un efecto en la concentración de las plaquetas y de los factores de crecimiento.¹⁸ Según el conocimiento de los autores, en el caso de los caninos, aún no existe un método estándar de centrifugación para la obtención de mayor concentración de plaquetas y de TGF- β 1.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la concentración de factor de crecimiento transformante beta 1 en plasma canino, utilizando dos centrifugaciones iniciales distintas, con el fin de determinar con qué método se puede obtener mayor cantidad de TGF- β 1 y si el proceso de centrifugación influye en la concentración de TGF- β 1.

Materiales y métodos

Pacientes y recolección de sangre

Para el presente estudio se utilizaron quince caninos sin raza definida, con edades entre los 10 meses y ocho años, con pesos corporales superiores a 10 kg. El criterio de inclusión de los pacientes para el estudio fue que estuvieran sanos al momento de la toma de muestra, es decir, debían estar clínicamente sanos y no presentar alteraciones en el hemograma al momento de la toma de muestra de sangre. Para la recolección de sangre, se procedió a depilar el antebrazo y preparar la zona de forma aséptica. Se colectaron de cada perro seis mililitros (ml) de sangre mediante punción de la vena cefálica con una jeringa de 10 ml y una aguja de 21 G (Shandong Weigao Group, China) y fueron procesadas inmediatamente.

Preparación de las muestras

De cada perro se obtuvieron tres muestras de 2 ml separadas en tubos con EDTA. Una muestra para el análisis de hemograma realizado mediante hemograma automatizado (Abaxis VetScan HM2, Union City, California, USA); una muestra para procesarla con el método de centrifugación inicial (Grupo 1) que consistió en centrifugar (Centrifuga BOECO C-28) las muestras a 1500 rpm por cinco minutos (RCF 1292), y una muestra para el segundo método de centrifugación inicial (Grupo 2) que consistió en centrifugar las muestras a 3500 rpm por cinco minutos (RCF 1583). Una vez centrifugadas las muestras de ambos grupos, se procedió a recolectar aproximadamente 1.000 μ l de plasma por encima de la interfaz eritrocitos-plasma con la ayuda de una micropipeta de volumen fijo de 1.000 μ l, los cuales fueron depositados en tubos de tapa roja (sin aditivos), para ser sometidos a una segunda centrifugación a 1500 rpm por cinco minutos (RCF 1292). Posteriormente, con la ayuda de una micropipeta de volumen fijo de 400 μ l, se recolectaron los primeros 400 μ l de ambas muestras, las cuales fueron depositadas en tubos eppendorf y se realizaron frotis para efectuar el recuento manual de plaquetas; una vez realizado lo anterior, se congelaron los tubos a -20°C hasta realizar el test de ELISA.

Concentración de TGF- β 1

La determinación de TGF- β 1 del PRP,

se realizó tomando la fracción restante de 400 μ L, la cual fue sometida al test de ensayo inmunoenzimático ELISA^e (Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- β 1 MB100B, del laboratorio R&D System), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de tipo descriptivo utilizando un software comercial (SPSS 13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL and confidence interval analysis [CIA], v.2.1.2, University of Southampton, Southampton, UK). Para comprobar si la distribución de los datos era normal, se realizó la prueba de Kolmogorov Smirnov. La hipótesis de distribución normal fue aceptada, por lo que los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA). Todos los resultados se presentaron como media y sus respectivas desviaciones estándar y se aceptó un valor de $P < 0,05$ como significativo.

Resultados

Los recuentos de los TGF- β 1 obtenidos con el test de ensayo inmunoenzimático ELISA^e (Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- β 1 MB100B, del laboratorio R&D System) con las 2 centrifugaciones iniciales (Grupo 1: 1500 rpm por 5 minutos y Grupo 2: 3500 rpm por 5 minutos) y posteriormente a la segunda centrifugación (1500 rpm por 5 minutos) se reporta en la Figura 1. Con las concentraciones obtenidas en el grupo 1, con una primera centrifugación a bajas revoluciones, se pudo obtener una concentración media de 19,45 pg/ml, la cual fue significativamente mayor ($P = 0,011$) al compararla con el grupo 2, con una centrifugación a altas revoluciones, en la cual se obtuvo una concentración media de 12,39 pg/ml.

Grupo 1: Concentración de TGF- β 1 obtenida con una primera centrifugación de 1500 rpm por cinco minutos (RCF 1292).

Grupo 2: Concentración de TGF- β 1 obtenida con una primera centrifugación de 3500 rpm por 5 minutos (RCF 1583). ^a Medias seguidas de letras distintas representan una significancia estadística ($P < 0,011$).

	Concentración de TGF- β 1
Grupo 1	19,45 (\pm 7,75) pg/ml ^a
Grupo 2	12,39 (\pm 6,08) pg/ml ^a

Figura 1. Concentración de TGF- β 1 obtenidos con los dos métodos de centrifugación en sangre de perros ($n = 15$). Valores expresados como media (\pm desviación estándar).

Discusión

Nuestros resultados demuestran que, a menor centrifugación inicial (1500 rpm), se obtiene una mayor cantidad de plaquetas; dichos resultados son similares a estudios en equinos¹⁸ y en caninos,²⁰ aunque en ambos trabajos se concentraron plaquetas con una centrifuga de uso humano, en la cual sólo se realiza una sola centrifugación a diferencia del presente estudio, en donde se realizaron dos centrifugaciones continuas de cada muestra, para así obtener PRP.⁶

Ya en el año 1999 se formulaba un procedimiento funcional para concentrar plaquetas,²¹ bajo el principio de centrifugación en humanos y hasta la fecha se han realizado numerosos estudios pudiéndose así obtener recomendaciones de variaciones de centrifugación para la obtención de PRP en medicina humana. Por lo que se puede decir que los parámetros para la obtención de PRP en humanos se encuentra definido, a diferencia de lo que sucede en medicina veterinaria, en donde existen pocos estudios relacionados a la obtención de PRP.^{18, 22, 23, 20, 24} El enriquecimiento de plaquetas observado en medicina humana a través de un paso de centrifugación a bajas revoluciones, permitiendo la remoción de eritrocitos y células nucleadas para concentrar gran parte de plaquetas, se encuentra comprobado y existen centrifugas especiales y recomendaciones estandarizadas,^{25, 26} a diferencia de lo que sucede en perros, en donde no existe evidencia suficiente que demuestre que la misma calidad de separación citológica ocurra con similares procesos de concentración de PRP, pero se podrían esperar resultados disímiles, considerando que existen diferencias en la sedimentación de plaquetas humanas y caninas.^{27, 28} Un estudio demostró que la obtención de PRP en humanos es distinta al de caninos utilizando las recomendaciones para el proceso en personas.²⁰ Los resultados del presente estudio demuestran que, al utilizar una centrifugación inicial mayor (3500 rpm) se obtiene menor cantidad de TGF- β 1 final, lo cual puede influenciar negativamente a la obtención de PRP. La fuerza de la centrifugación puede tener una influencia importante sobre las plaquetas, debido a que dichas fuerzas centrífugas pueden destruir las plaquetas y favorecer su activación temprana, liberándose así los factores de crecimiento prematuramente; conllevando esto a una pérdida de plaquetas y de factores de crecimiento.^{24, 29}

Con los resultados obtenidos, se pudo comprobar que el método de centrifugación de la sangre de perros tiene influencia sobre la concentración de TGF- β 1 y puede ser un factor relevante a considerar en la obtención de plaquetas y de TGF- β 1 en perros. Bajas revoluciones fueron

más favorables para obtener mayor cantidad de TGF-β1 en plasma de perros. Es necesario realizar futuras investigaciones relacionadas a la obtención de plaquetas y de factores de crecimiento, con el fin de estandarizar un método en perros que permita concentrar la mayor cantidad de dichos productos.

Referencias bibliográficas

- Hauschild G, Merten HA, Bader A, Uhr G, Deivick A, MeyerLindenberg, et al. Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of beta-tricalciumphosphate and platelet rich plasma-a case report. *Vet Comp Orthop Traumatol*; 2005, (18): 52-54.
- Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res*; 2007, (68): 290-296.
- Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *J Am Acad Orthop Surg*; 2009, 17, 602-608.
- Sánchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med*; 2009, (239): 345-354.
- Bosch G, Van Weeren P, Barneveld A, Van Schie HT. Computerised analysis of standardized ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet J*; 2011, (187): 92-98.
- Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dent*; 2001, (10): 225-228.
- Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br*; 2009, (9): 987-996.
- Weibric G, Buch RS, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors*; 2002, (20): 93-97.
- Laurencin CT. Bone graft substitutes. Rossemont. ASTM international. Illinois, USA; 2003.
- Braun S, Auf dem Keller U, Beer HD, Krampert M, Muller M, Werner S. Growth factors in development, repair and disease. *Eur J Cell Biol*; 2002, (81): 375-382.
- Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. Latent TGF-β binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol*; 2005, (37): 38-41.
- Huang SS, Huang JS. TGF-β control of cell proliferation. *J Cell Biochem*; 2005, (96): 447-462.
- Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol*; 2008, (26): 910-913.
- Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, et al. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*; 2010, (18): 472-479.
- Lee KS, Shetty AA, Kim SJ, Kim YJ, Jun YJ, Choi NY, et al. Intra-articular injections of platelet-rich plasma in patients with knee pain of articular cartilage origin (degenerative chondropathy and early OA). *J Tissue Eng Regen Med*; 2013, (10): 329-335.
- Lind M, Overgaard S, Ongpipattanakul B, Nguyen T, Bünger C, Soballe K. Transforming growth factor-β1 stimulates bone on growth to weight loaded tricalcium phosphate coated implants: An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg*; 1996, (78): 377-382.
- Carmona JU, Lopez C, Prades M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. *Arch med vet*; 2009, (41): 175-179.
- Kissich C, Gottschalk J, Lochmann G, Einspanier A, Böttcher P, Winter K, et al. Biochemische Eigenschaften des equinen Autologous Conditioned Plasma® (ACP). *Pferdeheilkunde*; 2012, (2): 258-267.
- Perman V. The blood smear. In: Perman V editor. Notes in laboratory medicine, 1st ed. University of Minnesota. St. Paul, USA; 2002: 1-24.
- Stief M, Gottschalk J, Ionita JC, Einspanier A, Oechtering G, Böttcher P. Concentration of platelets and growth factors in canine autologous conditioned plasma. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol*; 2011, (24): 122-125.
- Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 1999, (14): 529-535.
- López C, Giraldo CE, Carmona JU. Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: estudio celular. *Arch Med Vet*; 2012, (44): 109-115.
- Silva RF, Rezende CMF, Paes-Leme FO, Carmona JU. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas felinas: estudio celular. *Arch Med Vet*; 2011, (43): 187-190.
- Sutter WW, Kaneps AJ, Bertone AL. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res*; 2004, (65): 924-930.
- Buhr M, Siekmann W. Intra-articular injection of thrombocyte-enriched plasma for the treatment of cartilage damage. A clinical observation study [White Paper]. Naples, FL, USA: Arthrex INC; 2007.
- Buhr M, Siekmann W. Intraarticular injection of platelet rich plasma for cartilage repair. *Orthopädische Praxis*; 2009, (45): 10-16.
- Clemmons RM, Bliss EL, Dorsey-Lee MR, Seachord CL, Meyers KM. Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals. *Thromb Haemost*; 1983, (50): 838-43.
- Van Wie BJ, Hustvedt EL. Particle interaction effects on blood cell sedimentation and separations. *Biorheology*; 1988, (25): 651-662.
- Dohan DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*; 2009, (27): 158-167.
- White G, Escolar G. EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading. *Platelets*; 2000, (11): 56-61.