

EVALUACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO PARA CONCENTRAR PLAQUETAS EQUINAS, EN EL LABORATORIO CLÍNICO

EVALUATION OF A NEW PROTOCOL TO CONCENTRATE EQUINE PLATELET IN THE CLINICAL LABORATORY

Diego Lenín Espinoza Mejía y Alvaro Sánchez España

Carrera de Pecuaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, ubicado en el km 2.7 vía Calceta-El Morro-El limón, sector El Gramal

Contacto:alvarosanz69@yahoo.com

RESUMEN

El objetivo de esta investigación consistió en evaluar un nuevo protocolo para obtener Concentrados Autólogos de Plaquetas Equinas (APCs) por el método del tubo de doble centrifugación. Se utilizaron caballos criollos colombianos, clínicamente normales. Los APCs fueron obtenidos a partir de sangre venosa depositada en tubos con solución anticoagulante de citrato de trisodio, ácido cítrico y dextrosa que fueron centrifugados durante 10 minutos a 900 rpm (128 g) para aspirar el 50 % de la fracción plasmática más cercana a la capa leucocitaria, esta porción fue centrifugada nuevamente por 10 minutos a 1200 rpm (227 g), obteniendo un 50 % en la parte inferior del contenido del tubo. Los recuentos celulares en la sangre entera y los APCs presentaron diferencias estadísticas significativas respecto a los valores de plaquetas ($P < 0.01$) y leucocitos ($P < 0.05$) Se encontró correlación positiva de Pearson ($\rho = 0.9133$) entre el recuento de leucocitos y de plaquetas presentes en los APCs. La eficiencia de colección de plaquetas fue de 67%, con un incremento de 238% y una concentración de 338%. Se calculó el costo económico del nuevo protocolo en 10.28 dólares. En conclusión, el nuevo protocolo de centrifugación doble en tubo evaluado es eficiente, simple y de bajo costo para la producción APCs y puede ser usado como terapia regenerativa de heridas y lesiones en equinos.

Palabras clave: plasma, autólogos, factores de crecimiento, leucocitos, doble centrifugación

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate a new protocol for equine autologous platelet concentrates (APCs) by the method of double centrifugation tube. Colombian Creole horses were used, clinically normal. APCs were obtained from venous blood deposited in tubes with anticoagulant solution of trisodium citrate, citric acid and dextrose, centrifuged for 10 minutes at 900 rpm (128 g) to draw 50% of the plasma fraction to the nearest blood differential coat, this portion was centrifuged again for 10 minutes at 1200 rpm (227 g) to obtain 50% in the bottom of the tube contents. Cell counts in blood and APCs show significant statistical differences regarding platelet values ($P < 0.01$) and leukocytes ($P < 0.05$). Positive correlation of Pearson was found ($\rho = 0.9133$) between the leukocyte count and APCs present in platelets. The platelet collection efficiency was 67 %, with an increase of 238 % and a concentration of 338 %. The economic cost was calculated of the new protocol at 10.28 dollars. In conclusion, the new double centrifugation tube protocol evaluated is efficient, simple and inexpensive to produce APCs and it can be used as regenerative therapy of wounds and injuries in horses.

Keywords: Plasma, autologous growth factors, leukocytes, double centrifugation .

INTRODUCCIÓN

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es un producto autólogo, atóxico y no inmunorreactivo que se obtiene de la sangre. Existen estudios acerca de los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas que inducen la formación de hueso al aumentar su concentración en el lugar de aplicación, confirmando una habilidad plural al PRP para acelerar fenómenos regenerativos, basándose en el alto potencial mitógeno del producto (Beca *et al.*, 2007).

Las plaquetas son fundamentales para la reparación tisular de las heridas, ya que secretan factores de crecimiento, los cuales inducen quimiotaxis, proliferación y diferenciación celular, neovascularización y producción de la matriz extracelular. Se ha propuesto el uso de Concentrados Autólogos de Plaquetas (APCs) para acelerar la cicatrización de heridas, disminuir la inflamación, estimular la capacidad regenerativa de los tejidos lesionados, disminuir la actividad fibroblástica y la producción de tejido cicatricial no funcional (Carmona *et al.*, 2011).

El mismo autor cita que los APCs pueden ser obtenidos mediante diferentes métodos. Cada método produce APCs de diferente calidad celular y molecular debido al manejo del proceso. Recientemente, se ha generado información básica y clínica que justifica el uso de APCs en caballos con enfermedades degenerativas del aparato músculo esquelético equino como la osteoartritis, tendinopatías y desmopatías.

El uso clínico del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es muy variado y cada vez, surgen nuevas e insospechadas aplicaciones en las cuales este recurso autólogo y económico, es una alternativa biológica que mejora el bienestar animal, pero su eficacia depende del método o proceso de obtención, debido a que distintas formas de preparación del PRP se obtienen productos con distintas propiedades biológicas y distinto potencial terapéutico (Beca *et al.*, 2007).

En la actualidad el mejor protocolo es descrito por Carmona *et al.* (2009) mediante la técnica de doble centrifugación (120 g por 5 min. y 240 g por 5 min.) en los que se obtuvo un promedio de 5 mL de APC fue obtenido a partir de cada 75 ml de sangre entera.

El análisis de APC reveló una baja concentración de 250 000 plaquetas y 8680 leucocitos por mililitro.

Esto no es un nivel aceptable ya que según Carmona *et al.* (2011) concluyen mediante estudio de casos clínicos, que se debe entender el término “concentrado de plaquetas” como plasma con una suspensión de plaquetas (viables) entre 400 a 600 mil plaquetas por microlitro o milímetro cúbico.

Es por eso que se plantea este trabajo con el objetivo evaluar un nuevo protocolo por el método manual o del tubo, de doble centrifugación, que permita obtener altos niveles de concentrados autólogos de plaquetas en el laboratorio clínico de la ESPAM MFL, abriendo una ventana para la investigación de aplicaciones clínicas de este recurso autólogo, que tiene un gran potencial terapéutico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales.- Fueron utilizados cinco equinos machos raza criollo colombiano, con una edad promedio de cinco años. Estuvieron clínicamente sanos al momento de la recolección de la sangre. Estos fueron evaluados mediante examen físico y hemograma. Los caballos se encontraban en condiciones similares de alimentación y manejo, a convenio de la asociación de caballistas de Calceta, ubicados en la asociación de ganaderos del cantón Bolívar.

Obtención del concentrado autólogo de plaquetas.- Se procedió con una antisepsia del sitio de venopunción, luego se realizó la extracción de 30 mL de sangre cada uno de los 5 equinos seleccionados, mediante punción de la vena yugular con un catéter mariposa 18 G (NIPRO. scalp vein set), acoplado con una jeringa de 10 mL (Vangerin).

Se obtuvo por cada equino 3 tubos, de 10 mL de sangre que fue centrifugada en tubos de 15 mL (CORNING) con 1.5 mL de anticoagulante solución A de (ACD), citrato de trisodio (22 g/L), ácido cítrico (8 g/L) y dextrosa (24.5 g/L) (HAEMONETICS), luego se homogenizaron realizando 10 movimientos de giro suaves.

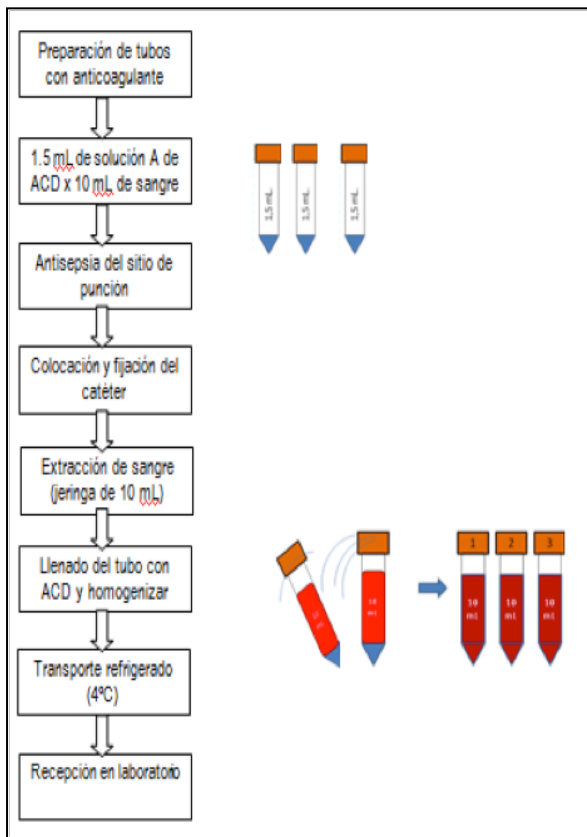


Figura 1. Proceso de la extracción de sangre

Se realizó el protocolo de centrifugación, controlando parámetros de tiempo y revoluciones por minuto (RPM) con doble centrifugado. El protocolo consiste en 900 rpm (128 fuerza g) por 10 minutos y segunda centrifugación 1200 (227 fuerza g) por 10 minutos, en la centrifuga (C-28A BOECO GERMANY). La fuerza (g) fue convertida a (RPM) con un radio de centrifugación de 141 mm en la calculadora de RCF.

Se obtuvo una separación con 4.5 mL de volumen del paquete vascular (Porción roja) y 7 mL de plasma aproximadamente en todos los tubos centrifugados y posteriormente se efectuó la aspiración del plasma en la cámara de flujo laminar con una aguja espinal (NI-PRO Medical Corporation, Quito, Ecuador) 25 G 0.50 mm de 9 centímetros, acoplada a una jeringa de plástico de 10 mL. Se debe aspirar siempre desde arriba hacia abajo.

Se obtuvieron dos fracciones diferentes del plasma, las cuales fueron introducidas en tubos de 10 mL sin aditivo (VACUTECH, China) clasificadas arbitrariamente como Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) con 3.5 mL y PRP con 3.5 mL aproximadamente.

El PPP clasificado como el 50% de la fracción plasmática inmediatamente superior al PRP. El PRP considerado como el 50% de la fracción plasmática más cercana a la capa leucocitaria (buffycoat), en esta porción se presenta un punto crítico del proceso y se realizó aspirando gradualmente en descenso cada vez más profundo a la capa leucocitaria en cada una de las muestras.

Esto se debe hacer sin aspirar células de la porción roja ya que luego de la segunda centrifugación, se presenta un exceso de glóbulos rojos en el fondo del tubo.

El PPP fue descartado y el PRP fue nuevamente centrifugado 1200 rpm. (227 g) por 10 minutos, luego se realizó una nueva separación, obteniendo el 50% de la porción inferior del tubo, clasificado como APC.

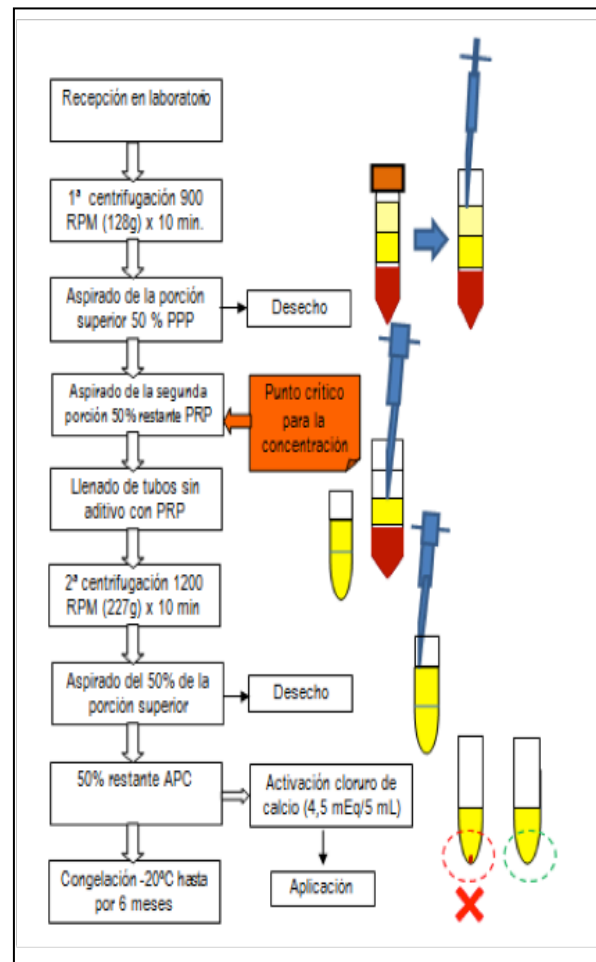


Figura 1. Proceso de la centrifugación y separación del plasma.

Se obtuvo aproximadamente 2 mL de APC por cada 10 mL de sangre, que fueron colocados en un tubo sin aditivo para el

análisis por impedancia volumétrica para hemograma en el laboratorio de análisis clínico “VitaLab” ubicado en Calceta. Los parámetros hematológicos evaluados fueron: conteo de plaquetas/ μL (PLT/ mm^3), conteo de glóbulos blancos (WBC/ mm^3).

El valor promedio de los datos hematológicos fue usado en el análisis estadístico. Se aplicó una cadena de frío para el traslado de las muestras de sangre y de los APCs en una hielera pequeña (COLEMAN) a 4°C para mantener las muestras en buenas condiciones.

Se analizaron por duplicado mediante hemograma automatizado. Los parámetros hematológicos evaluados incluyeron: hematocrito (PCV), recuentos de plaquetas (PLT), leucocitos (WBC).

Análisis estadístico.- Los valores de sangre entera y del concentrado autólogo de plaquetas (APC), se compararon mediante la prueba de Student (t) para muestras pareadas.

Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson (ρ) para determinar el grado de asociación entre los valores de leucocitos y plaquetas en los APCs obtenidos.

Los resultados del hemograma se presentaron descriptivamente, con promedios y rangos de sangre entera y APCs mediante cuadros y figuras de barras.

La eficiencia de colección de plaquetas se determinó mediante la fórmula de Weibrich *et al.* (2003) citado por Silva *et al.* (2011a): (Volumen de APC x recuento de plaquetas en el APC/volumen de sangre entera x recuento de plaquetas en sangre entera) x 100.

Concentración de plaquetas: (Recuento de plaquetas en el APC/ Recuento de plaquetas en sangre entera) x 100.

Porcentaje de incremento de plaquetas: (Recuento de plaquetas en el APC – Recuento de plaquetas en sangre entera/ Recuento de plaquetas en sangre entera) x 100.

Se aceptó una diferencia estadísticamente significativa de $P = 0.01$ y $P = 0.05$ para t, y $P = 0.05$ para ρ .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuentos celulares en sangre entera y en concentrado autólogo de plaquetas equinas.- Los recuentos celulares de la sangre entera y los APCs presentaron diferencias

estadísticamente significativas respecto a los valores de plaquetas ($P < 0.01$) y leucocitos ($P < 0.05$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Los valores de sangre entera y del APC.

| Variantes | Concentración de plaquetas/ mm^3 | Concentración de leucocitos/ mm^3 |
|---------------|---|--|
| Sangre entera | 158 800 | 7 780 |
| APC | 536 400 | 16 220 |
| Oa | 69.49 | 5625.7 |
| Tc | 5.42** | 2.05* |

**($P < 0.01$), *($P < 0.05$) Estadísticamente significativas

Se obtuvo un promedio de 536 400 plaquetas/ mm^3 , que demuestra una alta concentración en comparación con la técnica de doble centrifugación (120 g por 5 min. y 240 g por 5 min.) que produjo una concentración de 250 000 plaquetas/ mm^3 , descrita por Carmona *et al.* (2009), y se acerca a los valores obtenidos mediante el método de aféresis descrito por Carter *et al.* (2003) quienes obtuvieron 490 000 plaquetas/ mm^3 . Es inferior al descrito por Sutter *et al.* (2004) (855 000 plaquetas/ mm^3) por el método semiautomatizado de buffycoat (1'472000 plaquetas/ mm^3) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados del análisis hematológico, promedios y rangos.

| Animales | Sangre entera | | APC | |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Plaquetas/ mm^3 | Leucocito/ mm^3 | Plaquetas/ mm^3 | Leucocito/ mm^3 |
| 1 | 204000 | 9900 | 372000 | 1500 |
| 2 | 141000 | 7300 | 438000 | 9200 |
| 3 | 134000 | 7400 | 506000 | 12400 |
| 4 | 147000 | 6700 | 638000 | 16200 |
| 5 | 168000 | 7600 | 728000 | 41800 |
| Promedio | 158800 | 7780 | 536400 | 16220 |
| Rango | 70.000 | 3200 | 356000 | 40300 |
| min-max | (134000-204000) | (6700-9900) | (372000-728000) | (1500-41000) |

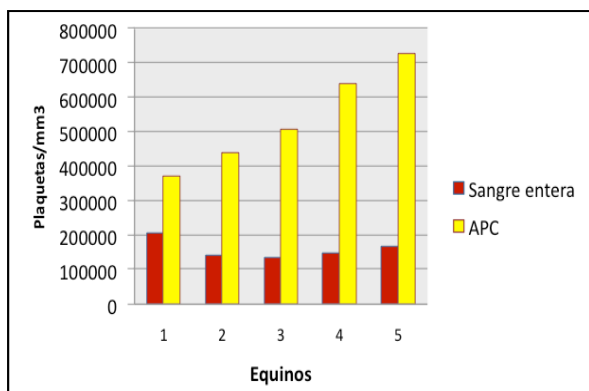


Gráfico 1. Recuento individual de plaquetas en sangre entera y APC

En el Gráfico 2 se presenta el aumento en recuentos de plaquetas que se obtuvo mediante el nuevo protocolo y demuestran un nivel aceptable, ya que según Carmona *et al.* (2011) se debe entender el término “concentrado de plaquetas” como plasma, con una suspensión de plaquetas (viables) entre 400 a 600 mil plaquetas por microlitro o milímetro cúbico.

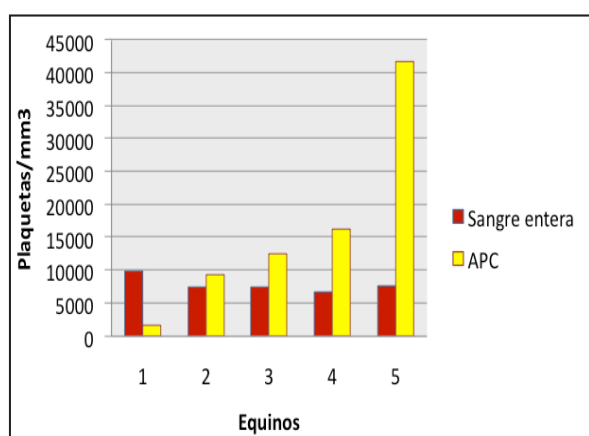


Gráfico 2. Recuento individual de leucocitos en sangre entera y APC

En el Gráfico 3 se presentan un aumento gradual en cada uno de los recuentos de leucocitos que se obtuvieron mediante el nuevo protocolo, comparados con los recuentos en sangre entera., debido al procedimiento de aspiración de la última porción plasmática (PRP) lo cual demuestra que el más adecuado es el 1 y 2, ya que según Schnabel *et al.* (2008) la concentración de leucocitos debería minimizarse y, en cualquier caso, no sobrepasar la concentración o recuento presente en la sangre venosa.

Correlación de Pearson entre el recuento de leucocitos y plaquetas presentes en los APCs.- Se presentó una correlación de Pearson positiva ($\rho = 0.9133$, $P < 0.05$), ($R^2 = 0.834$) entre el recuento de plaquetas y leucocitos en los APCs obtenidos. No se encontraron datos acerca de la correlación de plaquetas y leucocitos en el APC descritos en sangre equina. Sin embargo, existen investigaciones realizadas mediante el método del tubo de doble centrifugación en bovinos, que determinaron una correlación positiva entre plaquetas y leucocitos ($\rho = 0.75$, $P = 0.0001$) (López *et al.*, 2012) (Gráfico 4).

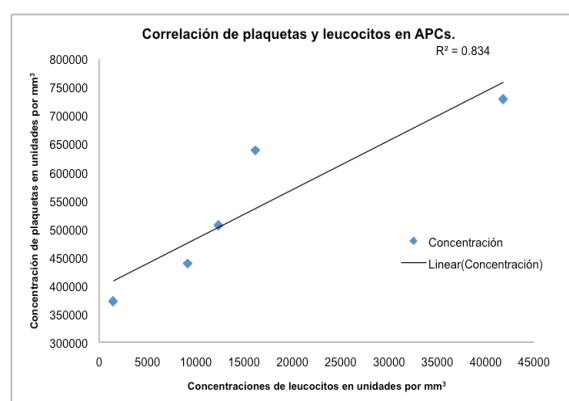


Gráfico 3. Correlación entre los recuentos de plaquetas y leucocitos en APCs obtenidos mediante el nuevo protocolo

Esta correlación se debe al proceso de separación de la última porción que se realizó, aspirando gradualmente en descenso cada vez más profundo a la capa leucocitaria en cada una de las muestras, razón por la que se obtuvo un recuento en la primera muestra de $1500/\text{mm}^3$ WBC y $372\,000/\text{mm}^3$ PLT y en la última muestra $41\,800/\text{mm}^3$ WBC y $728\,000/\text{mm}^3$ PLT de esta manera se produjo un promedio de $16\,220/\text{mm}^3$ WBC lo cual disminuye la calidad del APC, debido a que según Marx (2004) concentrar una gran cantidad de plaquetas viables con un bajo número de leucocitos, es una condición altamente deseable en un PRP.

Es importante señalar que la función exacta de los leucocitos en los APCs no se ha establecido. Sin embargo, se cree que la concentración de un gran número de glóbulos blancos en los APCs podría ser perjudicial para los tejidos tratados (Zimmermann *et al.*, 2003).

Sobre este último aspecto se debe considerar la interrogante del papel (benéfico o perjudicial) de los leucocitos presentes en el APC, la cual, hasta el momento, aún no ha sido resuelta (Carmona *et al.*, 2011).

Eficiencia de colección de plaquetas del nuevo protocolo.-Se determinó la eficiencia de colección de plaquetas en 67%, un incremento de 238% y una concentración de 338%, que determina en proporción de 3.38 más que en el valor en sangre entera.

Esto demuestra que se obtuvo un protocolo eficiente. En otras investigaciones no se encuentran datos del porcentaje de eficiencia de colección de plaquetas por el método del tubo de doble centrifugación descritos en sangre equina, sin embargo existen investigaciones realizadas por un equivalente método manual en sangre bovina con eficiencia de colección de plaquetas de 25.4% (López *et al.*, 2012), en sangre canina fue de 29.9% (Silva *et al.*, 2011a) y en sangre felina de 50% (Silva *et al.*, 2011b).

Costo económico del nuevo protocolo para obtener concentrados autólogos de plaquetas.- El costo económico del nuevo protocolo para obtener concentrados autólogos de 10.28 dólares americanos por cada 6 mL de APC, obtenidos a partir de 30 mL de sangre equina en un tiempo de 30 minutos bajo condiciones de laboratorio, y 15 minutos para la extracción de sangre, demuestra su simplicidad y bajo costo, mientras que los métodos semiautomatizados son costo-limitantes, ya que requieren kits y centrifugas especializadas (Carmona *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

La aplicación del nuevo protocolo para concentrar plaquetas en equinos por el método manual o del tubo de doble centrifugación logró aumentarla concentración de plaquetas en un 338% y leucocitos en un 208% más que el recuento en sangre entera respectivamente.

Se encontró que existe una correlación positiva entre la concentración de plaquetas y leucocitos en los APC obtenidos.

El nuevo protocolo empleado para concentrar plaquetas es eficiente en un 67%.

El costo económico del nuevo protocolo indica que es un método simple y barato, debido a que el costo económico para obtener 6 mL de APC a partir de 30 mL de sangre equina es de 10.28 dólares americanos.

LITERATURA CITADA

- Beca, T; Hernández, G; Morante, S; Bascones, A. 2007. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. Madrid. ES. AvPeriodonImplantol. 19 (1):39-52.
- Carter, C; Jolly, D; Worden, C; Hendren, D; Kane, C. 2003. Plateletrich gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. ExpMol-Path. 74:244-255.
- Carmona, J; Argüelles, D; Prades, M. 2008. Niveles de factor de crecimiento transformante beta-3 y óxido nítrico en cuatro concentrados autólogos de plaquetas y plasma derivados de sangre equina. Bellaterra, Barcelona. ES. ArchMedVet. 40:155-160.
- Carmona, J; Prades, M; Argüelles, D. 2009. Concentrados autólogos de plaquetas como tratamiento de lesiones de tejidos blandos del aparato locomotor en caballos. Barcelona. ES. ArchMedVet. Vol. 41. p 77- 82.
- Carmona, J; López, C; Giraldo, C. 2011. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, CO. ArchMedVet. 43:1-10.
- López, C; Giraldo, C; Carmona, J. 2012. Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: estudio celular. Caldas. Co. ArchMedVet. 44:109-115.
- Marx, R. 2004. Plasma rico en plaquetas: Evidencia para Apoyar Su Uso. J Oral MaxillofacSurg. 62:489-496. (En línea). EU. Consultado, 13 de jul. 2012. Formato PDF Disponible en www.falloplastica.net/fp/pdf/prp05.pdf.
- Schnabel, L; Mohammed, H; W; Jacobson, M; Fortier, L. 2008. Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explants cultures. EquineVet J. 40: 260-265.
- Silva, R; Rezende, C; Paes-Leme, F; Carmona, J; 2011a. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas. Minas Gerais. Br. ArchMedVet. 43:95-98.

- Silva, R; Rezende, C; Paes-Leme, F; Carmo-
na, J; 2011b. Evaluación del método
del tubo para concentrar plaquetas fe-
linas. Minas Gerais. Br. Arch Med Vet.
43:187-190.
- Sutter ,W; Kaneps, A; Bertone,A. 2004. Com-
parison of hematologic values and trans-
forming growth factor- β and isulin-like
growth factor concentrations in platelets
concentrates obtained by use of buffy
coat and apheresis methods from equine
blood. Am J Vet Res. Vol. 65. p 924-930.
- Zimmermann, R; Arnold, D; Strasser, E; Rin-
gwald, J; Schlegel, A; Wiltfang, J; Eck-
stein, R. 2003. Sample preparation tech-
nique and white cell content influence
the detectable levels of growth factors
in platelet concentrates. Vox Sang. Vol.
85. p 283-289.