

Evaluación de los niveles del factor de crecimiento transformante beta 1 y beta 3 en plasma y líquido peritoneal de caballos con enfermedad abdominal aguda[#]

Evaluation of the transforming growth factor beta 1 and beta 3 levels in plasma and peritoneal fluid from horses with acute abdominal disease

D Argüelles^a, JU Carmona^b, M Prades^{a*}

^a Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

^b Grupo de Investigación Terapia Regenerativa, Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.

SUMMARY

There is few information about the molecules present in the peritoneal fluid of horses with colic that are related to the potential development of abdominal adhesions. Studies carried out in different species correlate high levels of transforming growth factor beta (TGF- β) series with the presence of abdominal adhesions. The aims of this study were: 1) to document and compare the plasma and peritoneal fluid levels of TGF- β_1 and TGF- β_3 in horses with acute abdominal disease and normal horses, 2) to correlate the levels of these peptides with the hemogram values and the cytological and biochemical peritoneal fluid findings. Plasma and peritoneal fluid samples from 104 horses were obtained: 29 were medical colics (15 were obstructive simple colic and 14 were inflammatory colic), 65 underwent abdominal surgery (30 horses suffered from ischemic problems and 35 from non ischemic problems), and 10 were controls. A hemogram was performed and peritoneal fluid cytology and TGF- β_1 and TGF- β_3 plasma and peritoneal fluid levels were determined by ELISA. The TGF- β_1 peritoneal fluid levels were statistically ($P < 0.05$) higher in ischemic colics and inflammatory colics compared with controls and other type of surgical or medical colics. In conclusion, the levels of peritoneal fluid TGF- β_1 are elevated in horses with acute abdominal disease in response to inflammation. The horses with strangulating lesions and peritonitis show greater alterations of TGF- β_1 levels.

Palabras clave: equino, complicaciones posquirúrgicas, adherencias, factores de crecimiento transformante beta.

Key words: equine colic, post-surgical complications, adhesions, transforming growth factor beta.

INTRODUCCIÓN

Numerosas moléculas han sido evaluadas en el líquido peritoneal de caballos con cólico con el objetivo de conocer el grado de compromiso intestinal, establecer la necesidad de cirugía y emitir un pronóstico; entre ellas se destacan la mieloperoxidasa (Grulke y col 2008), lactato (Latson y col 2005, Delesalle y col 2007), proteína de unión del ácido graso intestinal (I-FABP) (Nieto y col 2005), fosfatasa alcalina (Saulez y col 2004), factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 6 (Barton y Collatos 1999). Sin embargo, según la literatura revisada, no existen estudios en los que se hayan evaluado los niveles plasmáticos o peritoneales de moléculas (factores de crecimiento) relacionadas con el potencial desarrollo de adherencias en caballos con crisis abdominal aguda (cólico).

Las adherencias son una de las principales complicaciones postoperatorias tardías (después de un año) asociadas con cirugía abdominal en caballos (Mair y Smith 2005). Recientemente, Gorvy y col (2008) encontraron que las adherencias eran responsables del 28% de los casos de nuevas cirugías abdominales (relaparatomía) en caballos previamente operados de cólico. Los pacientes equinos con afecciones isquémicas del intestino delgado que requieren resección y enteroanastomosis presentan un menor pronóstico de sobrevivencia y mayores complicaciones postoperatorias (e.j.: adherencias, peritonitis, endotoxemia, íleo y laminitis) que caballos en los que sólo el colon está afectado, principalmente por obstrucciones simples (Phillips y Walmsley 1993, Singer y Livesey 1997, Muñoz y col 2008).

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β_1), TGF- β_2 , TGF- β_3 , y numerosas proteínas morfogenéticas óseas pertenecen a la superfamilia TGF- β (Schiller y col 2004). Estos péptidos son producidos por macrófagos, linfocitos, células endoteliales, fibroblastos, astrocitos, osteoblastos, osteoclastos y plaquetas (Javelaud y Mauviel 2004). Los TGF- β s son moléculas que potencialmente estimulan o inhiben la proliferación, diferenciación, motilidad, adhesión o la muerte celular. Lo anterior se

Aceptado: 08.04.2009.

[#] Financiado por el Colegio Europeo de Cirujanos Veterinarios.

* Edificio V 08193, Bellaterra, España; marta.prades@uab.es

puede producir en función del tipo y estado de desarrollo de cada célula en particular (Schiller y col 2004). Estos péptidos tienen una importante actividad sobre la matriz extracelular (ECM). De manera general, el TGF- β_1 produce aumento de la síntesis de ECM y el TGF- β_3 la inhibe. La expresión equilibrada de ambos factores de crecimiento es crucial para una adecuada cicatrización tisular (Theoret y col 2001, 2002).

Los factores de crecimiento transformante beta, especialmente el TGF- β_1 y TGF- β_2 , han sido implicados en el desarrollo de adherencias abdominales en ratas, ratones (Lucas y col 1996, Krause y col 1999, Ghellai y col 2000, Freeman y col 2003, Gorvy y col 2005) y seres humanos sometidos a cirugía abdominal (Chegini y col 2001, Holmdahl y col 2001, Hobson y col 2003), mientras que el TGF- β_3 ha sido considerado como una molécula con propiedades antagonicas a esos dos factores de crecimiento (Freeman y col 2003, Ferguson y O'Kane 2004, Gorvy y col 2005). Existe evidencia que indica la correlación de niveles incrementados de TGF- β s, principalmente TGF- β_1 , con la presencia de adherencias abdominales en seres humanos que fueron sometidos a laparotomía exploratoria (Chegini y col 2001, Cheong y col 2001, Rout y col 2005). Sin embargo, según el conocimiento de los autores, no existe ninguna investigación que documente los niveles del TGF- β_1 y TGF- β_3 en plasma y líquido peritoneal de caballos con cólico sin cirugía abdominal previa o en caballos sanos, libres de enfermedad gastrointestinal.

Los objetivos de esta investigación fueron determinar los niveles plasmáticos y peritoneales de TGF- β_1 y TGF- β_3 en caballos con diferentes tipos de cólico médico y quirúrgico (que no habían sido sometidos a cirugía abdominal previa) y en caballos sanos (libres de enfermedad abdominal gastrointestinal), para conocer cómo se pueden ver alterados estos péptidos en la fase prodrómica de los diferentes tipos de cólico. Además, correlacionar los niveles de estos factores de crecimiento con los hallazgos citológicos (número y tipo de leucocito) y bioquímicos (niveles de proteína total) del líquido peritoneal y con los resultados del hemograma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio clínico fue aprobado por la dirección del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), España.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio prospectivo fue realizado entre junio de 2005 y junio de 2006 con caballos admitidos por cólico (sin ninguna cirugía abdominal previa) durante ese periodo en la Unidad Equina, HCV-UAB, España. Únicamente se incluyeron aquellos pacientes en los que fue posible tomar muestras de sangre entera con EDTA para hemograma automatizado, sangre (plasma) en citrato de sodio para

determinación plasmática de TGF- β_1 y TGF- β_3 , líquido peritoneal para análisis citológico (recuento total y diferencial de leucocitos y determinación de proteína total) y determinación de los niveles peritoneales de TGF- β_1 y TGF- β_3 . Un grupo de 10 caballos clínicamente sanos, libre de alteraciones gastrointestinales, que recibía un programa de medicina preventiva que incluía vacunación anual y desparasitación periódica, fue sometido a los mismos análisis. Cada paciente con cólico fue evaluado mediante examen físico general, examen rectal, ecografía abdominal y análisis citológico del líquido peritoneal. Con base en los hallazgos de esos exámenes se determinó la causa fisiopatológica general del cólico y estos fueron clasificados, arbitrariamente por los autores, dentro de los siguientes cuatro grupos:

–*Cólico médico obstructivo simple (CMOS)*= Caballos con signos de dolor abdominal asociado a obstrucciones simples del intestino delgado o del colon mayor o menor, que fueron resueltos mediante tratamiento médico.

–*Cólico médico inflamatorio (CMI)*= Caballos con signos de dolor abdominal asociados a procesos de enteritis, colitis, enterocolitis o peritonitis no relacionada con cirugía, que fueron manejados con tratamiento médico.

–*Cólico quirúrgico isquémico (CQI)*= Caballos con signos de dolor abdominal asociado a lesiones estrangulantes (vólvulo, intususcepción, incarceration) u oclusivas (endoarteritis verminosa) del intestino delgado, colon mayor o menor, que fueron resueltos mediante tratamiento quirúrgico.

–*Cólico quirúrgico obstructivo simple (CQOS)*= Caballos con signos de dolor abdominal asociado con obstrucción simple de la luz (impactación) del intestino delgado, colon mayor o menor, que fueron resueltos mediante tratamiento quirúrgico.

La muestra de líquido peritoneal fue obtenida de la región paramediana derecha o izquierda (según cada caso en particular) más ventral del abdomen, mediante una cánula mamaria metálica de punta roma. Previa preparación aséptica e infiltración de lidocaína al 2%, se realizó una pequeña incisión (3 mm), con una hoja de bisturí N° 15, sobre la piel, subcutáneo y músculo recto abdominal, luego la cánula fue empujada hasta traspasar el peritoneo parietal y visceral y permitir la salida del líquido peritoneal. Un ml de líquido peritoneal fue depositado en un tubo con EDTA para análisis citológico y determinación de proteína total (g/dl) mediante refractometría (Estepa y col 2006). Cuatro y medio ml de líquido peritoneal fueron depositados en un tubo de citrato de sodio para la determinación de TGF- β_1 y TGF- β_3 . Cada tubo de citrato de sodio con líquido peritoneal fue centrifugado a 1800 g durante 8 minutos. El sobrenadante del líquido peritoneal sin el contenido celular fue alicuotado en tubos Ependorf y congelado a -70 °C para la posterior determinación de los factores de crecimiento, una vez que todas las muestras fueran completadas. Las muestras de sangre citratada fueron centrifugadas y el plasma almacenado de la misma manera que el líquido peritoneal.

Un total de 94 caballos con diferentes tipos de cólico fueron incluidos en el estudio. Veintinueve presentaban cólico médico, de los cuales 15 eran obstructivos simples (CMOS) y 14 inflamatorios (CMI). 65 caballos presentaron cólico quirúrgico, de los cuales 30 presentaban problemas de origen isquémico (CQI) y 35 problemas obstructivos simples (CQOS).

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TGF- β_1 Y TGF- β_3

Se determinaron los niveles de TGF- β_1 y TGF- β_3 en el plasma y líquido peritoneal de cada caballo. Las concentraciones de ambos factores de crecimiento fueron determinadas mediante una prueba de ELISA en *sandwich* desarrollada con anticuerpos comerciales para TGF- β_1 (Human TGF- β_1 ; R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) y TGF- β_3 humanos (Human TGF- β_3 ; R&D Systems, Abingdon, Reino Unido).

La prueba de ELISA fue realizada por duplicado en cada muestra. Se emplearon anticuerpos de captura para TGF- β_1 (R&D Systems (Part 840116) Europe, Abingdon, UK) y TGF- β_3 (R&D Systems (parte 840417), Abingdon, Reino Unido) murinos antihumanos a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ cada uno. Los anticuerpos de detección fueron un TGF- β_1 de pollo-antihumano (R&D Systems (parte 840117), Abingdon, Reino Unido) y un TGF- β_3 de cabra biotinilado antihumano (R&D Systems (parte 840418), Abingdon, Reino Unido) a concentraciones de 300 y 100 ng/ml respectivamente. La línea patrón fue hecha con TGF- β_1 (R&D Systems (parte 840118), Abingdon, Reino Unido) y TGF- β_3 (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) recombinantes humanos. Ambos TGF- β s fueron activados mediante una solución de ácido acético 2,5 N/urea 10 M y las muestras fueron diluidas 12-24 veces. Los ELISAs fueron revelados con un conjugado de estreptavidina a peroxidasa (R&D Systems (parte 840419), Abingdon, Reino Unido) y el substrato colorimétrico Fast OPD (Sigma, MO, USA.). La lectura fue realizada mediante un lector de ELISA (Anthos, Cutlek, Madrid, España) a 492 (TGF- β_1) y 540 nanómetros (TGF- β_3). El umbral de detección de ambas proteínas fue aproximadamente de 30 pg/ml.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS inc., IL, EE.UU.). Los datos fueron evaluados mediante pruebas no paramétricas, ya que los valores obtenidos no presentaron distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk $< 0,05$). Para hallar diferencias generales entre los grupos para las variables analizadas, excepto para los niveles plasmáticos y peritoneales de TGF- β_3 , se empleó una prueba de Kruskal-Wallis. Como prueba post-hoc se empleó una comparación no paramétrica de Wilcoxon, para muestras no apareadas. Se realizó evaluación de las correlaciones entre cada variable mediante la prueba de Spearman. Los valores de TGF- β_3

fueron analizados mediante una prueba generalizada de Wilcoxon (GWT), ya que una gran proporción de los resultados presentó valores censurados a la izquierda (Dawson-Saunders y Trapp 1993). Un valor de $P < 0,05$ fue aceptado como significativo para todas las pruebas. Todos los datos fueron presentados como medianas con sus respectivos rangos.

RESULTADOS

Hemograma. Los valores generales del hemograma (número total de leucocitos y hematocrito) no fueron estadísticamente diferentes para cada grupo de cólico o para el grupo de control. Sin embargo, el grupo de caballos con CMI presentó un menor número absoluto de neutrófilos (estadísticamente significativo ($P < 0,05$)) en comparación con los demás grupos de cólico, pero no frente al grupo control (cuadro 1).

Niveles plasmáticos de TGF- β_1 y TGF- β_3 . Los niveles plasmáticos de TGF- β_1 fueron similares entre cada grupo de cólico y el grupo control (cuadro 1). Los niveles plasmáticos de TGF- β_3 superiores a 30 pg/ml fueron únicamente detectados en 28 caballos (26,9%), de estos, 9 caballos fueron del grupo CQI, 11 pacientes fueron del grupo CQOS, 2 caballos pertenecían al grupo CMOS, 4 caballos fueron del grupo CMI y 2 caballos fueron del grupo control (cuadro 1). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas para este factor de crecimiento en el plasma de los grupos de caballos evaluados.

Análisis citológico y determinación de proteína total en líquido peritoneal. Los caballos de los grupos CQI, CQOS y CMOS no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al número de eritrocitos en líquido peritoneal. Sin embargo, los grupos CQI y CQOS difirieron de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) para ese mismo parámetro respecto a los grupos CMI y control.

Los caballos de los grupos control, CQI y CMI no difirieron entre sí de manera estadísticamente significativa respecto al número de leucocitos en el líquido peritoneal. Se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para ese mismo parámetro entre los grupos control, CQOS y CMOS. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para los leucocitos en líquido peritoneal entre los grupos CQOS y CMI. Por otra parte, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para el recuento de neutrófilos del líquido peritoneal de los grupos CMOS y CMI (cuadro 2). Los niveles de proteína total del líquido peritoneal tendieron a ser más altos en el grupo de caballos con CQI respecto a los caballos de los grupos CQOS y CMI y difirieron de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre el grupo control y el grupo CMOS. Igualmente, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CMI, el grupo Control y el grupo CMOS (cuadro 2).

Cuadro 1. Hemograma y niveles plasmáticos de TGF- β_1 y TGF- β_3 de los cuatro grupos de cólico y del grupo control (Los datos son presentados como medianas (rangos)).
Hemogram and plasmatic TGF- β_1 and TGF- β_3 levels in the four colic groups and the control group (Data is presented as the median (range)).

Variable	Control (<i>n</i> : 10)	Cólico quirúrgico isquémico (<i>n</i> : 30)	Cólico quirúrgico obstructivo simple (<i>n</i> : 35)	Cólico médico obstructivo simple (<i>n</i> : 15)	Cólico médico inflamatorio (<i>n</i> : 14)
Hematocrito (%)	31 (23-49)	33,9 (22-58)	32 (16-54)	35 (22-40)	35 (27-49)
Leucocitos (células x 10 ³ / μ l)	6,9 (3,3-15)	8,6 (1,6-22,8)	9,2 (4,4-12,9)	8,3 (2,2-43,5)	5,7 (2,2-11,3)
Neutrófilos (células x 10 ³ / μ l)	4,6 (0,5-12,8) a,b,c	7,2 (1,4-19,4) b	5,8 (2,3-11,8) b	6,8 (2,7-40) b	3,6 (0,9-8,5) a,c
Linfocitos (células x 10 ³ / μ l)	2,5 (1,6-4,1)	1,4 (0,4-4,5)	1,5 (0,4-4,3)	1,7 (1,2-2,7)	2,3 (0,3-7)
Monocitos (células x 10 ³ / μ l)	0,3 (0,1-0,6)	0,3 (0,1-0,7)	0,3 (0,1-1)	0,2 (0,1-13)	0,1 (0,1-0,5)
Eosinófilos (células x 10 ³ / μ l)	0,2 (0,03-0,49)	0,1 (0-3,9)	0,05 (0-0,2)	0 (0-0,15)	0,1 (0-0,2)
Basófilos (células x 10 ³ / μ l)	0 (0-0,05)	0 (0-0,1)	0 (0-0,1)	0 (0-0,1)	0 (0-0,1)
Plaquetas x 10 ³ / μ l)	140 (140-234)	192 (86-442)	177 (71-353)	147 (111-193)	150 (50-460)
TGF- β_1 plasmático (ng/mL)	3 (2,9-8,2)	4,1 (2,3-15,2)	4 (1,4-5,8)	3,7 (1,9-10,4)	4,2 (3,1-9,5)
TGF- β_3 plasmático (pg/mL)	< 30 (< 30-273,2)	< 30 (< 30-844,8)	< 30 (< 30-2017)	< 30 (< 30-349,7)	< 30 (< 30-119,9)

^{a,b} Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los grupos.

^{a,b} Different letters in the same row represent significant ($P < 0,05$) differences between groups.

Cuadro 2. Valores citológicos y niveles de proteína total, TGF- β_1 y TGF- β_3 en el líquido peritoneal de los cuatro grupos de cólico y del grupo control (Los datos son presentados como medianas (rangos)).

Cytological values and total protein, TGF- β_1 and TGF- β_3 peritoneal fluid levels in the four colic groups and the control group (Data is presented as the median (range)).

Variable	Control (<i>n</i> : 10)	Cólico quirúrgico isquémico (<i>n</i> : 30)	Cólico quirúrgico obstructivo simple (<i>n</i> : 35)	Cólico médico obstructivo simple (<i>n</i> : 15)	Cólico médico inflamatorio (<i>n</i> : 14)
Eritrocitos (células x 10 ⁶ / μ l)	0,1 (0-0,1) a	1,1 (0,2-4,3) b	0,4 (0-1) b	1,5 (0-1) a,b	0,03 (0,01-1) a
Leucocitos (células x 10 ³ / μ l)	1,6 (0,7-3,5) a	8,5 (0,02-64,1) a,b,c	4,7 (0,5-26) c	8,9 (0,5-13) b	9,3 (1,2-19) a,c
Neutrófilos (células x 10 ³ / μ l)	1 (0,6-1,3) a	10,9 (0,3-57) a	3,6 (0,1-9) a	0,5 (0,14-0,8) a,b	7,8 (0,4-16) a,c
Proteína Total (g/dl)	1,3 (1-3,7) a	3,5 (1-7) b	2,2 (0,4-4,2) a,b	2,3 (0,8-4,4) a	2,8 (0,8-7) b
TGF- β_1 (ng/mL)	0,7 (0,6-2,7) a	2 (1-11,8) b	1,4 (0,2-5,1) a	1,1 (0,1-2,6) a,c	2,4 (0,2-9,1) b,c
TGF- β_3 (pg/mL)	< 30	< 30 (< 30-140,4)	< 30 (< 30-1811)	< 30 (< 30-35,6)	< 30 (< 30-612,7)

^{a,b} Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los grupos.

^{a,b} Different letters in the same row represent significant ($P < 0,05$) differences between groups.

Niveles peritoneales de TGF- β_1 y TGF- β_3 . Los niveles de TGF- β_1 en el líquido peritoneal estuvieron incrementados de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre el grupo de caballos con CQI en comparación con el grupo control y el grupo de pacientes con CMOS y CQOS. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los valores del TGF- β_1 para el grupo de caballos con CQI y CMI (figura 1); sin embargo, los niveles peritoneales de ese factor de crecimiento observados en el grupo de caballos con CMI fueron estadísticamente diferentes en relación con el grupo control y los caballos del grupo CQOS (cuadro 2). Los niveles peritoneales de TGF- β_3 superiores a 30 pg/ml fueron detectados únicamente en 20 caballos (19,2%), de éstos, 8 pacientes pertenecían al grupo CQI, 9 caballos fueron del grupo CQOS, 1 caballo fue del grupo CMOS y 2 pacientes fueron del grupo CMI (cuadro 2). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas para este factor de crecimiento en el líquido peritoneal de los grupos de caballos evaluados.

De manera general, no se hallaron correlaciones estadísticamente significativas entre cada uno de los parámetros celulares o bioquímicos evaluados para cada grupo de cólico o en los caballos control del estudio.

DISCUSIÓN

Según la literatura revisada, éste es el primer estudio clínico en el que se describen y comparan los niveles plasmáticos y peritoneales del TGF- β_1 y TGF- β_3 en caballos con diferentes tipos de cólico y caballos sanos y se correlacionan los niveles (plasmáticos y peritoneales) de estos dos factores de crecimiento con los resultados del hemograma y de la citología del líquido peritoneal. La presencia de un menor recuento mediano de neutrófilos de los caballos del grupo CMI ($3,6$ neutrófilos $\times 10^3/\mu\text{L}$; valor de referencia: $2,7-6,7$ neutrófilos $\times 10^3/\mu\text{L}$ (Thrall 2006)) respecto a los demás grupos del estudio (cuadro 1), posiblemente estuvo relacionada con la presentación de un mayor grado de endotoxemia en los equinos de ese grupo, ya que una gran proporción de esos caballos fue neutropénica. La disminución del recuento de neutrófilos o la neutropenia periférica son hallazgos frecuentes en caballos con cólico, especialmente cuando presentan cuadros isquémicos prolongados, ya que una gran cantidad de endotoxinas pueden ser liberadas a la circulación, debido a un intestino necrótico o desvitalizado (Mair y col 1990). Posiblemente, los caballos del grupo CQI fueron operados de manera temprana y por esa razón no se produjo el suficiente daño intestinal como para detectar la neutropenia típica asociada con un cuadro de endotoxemia (Mair y col 1990). Por su parte, los valores de la citología del líquido peritoneal y los niveles de proteína total observados en los diferentes grupos de cólico y en los caballos clínicamente sanos del estudio fueron parecidos a los valores reportados por Matthews y col (2002).

Se utilizaron kits de ELISA humano para determinar los niveles plasmáticos y peritoneales de TGF- β_1 y TGF- β_3 ya que se ha encontrado una alta homología para todos los péptidos de la familia TGF- β entre mamíferos (Javelaud y Mauviel 2004) y existe un alta homología (99%) entre el TGF- β_1 humano y equino (Penha-Goncalves y col 1997). Sin embargo, según la literatura revisada, no se ha realizado la secuencialización del TGF- β_3 equino; aunque Theoret y col (2001, 2002) han empleado previamente un anticuerpo humano en un estudio de piel en caballos. La medición de ambos péptidos en plasma equino con kits humanos ha sido estandarizada y validada previamente (Argüelles y col 2006, Carmona y col 2008).

Los niveles plasmáticos de TGF- β_1 y TGF- β_3 observados en los pacientes con cólico y el grupo control del estudio (cuadro 1) no difirieron de los valores reportados en la literatura para estos dos factores de crecimiento en caballos (Argüelles y col 2006, Carmona y col 2008). Sin embargo, en personas sometidas a una segunda laparotomía exploratoria y especialmente aquellas con adherencias se

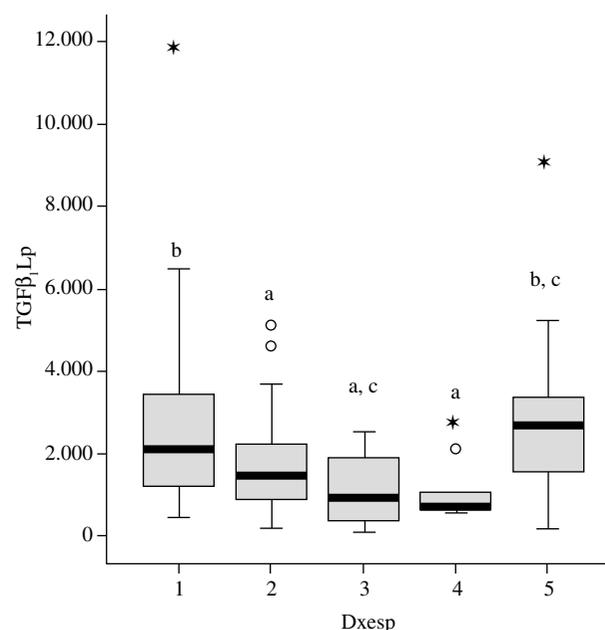


Figura 1. Niveles peritoneales del factor de crecimiento transformante beta 1 para cada grupo de cólico y el grupo control. TGF β_1 Lp: Factor de crecimiento transformante beta 1 en líquido peritoneal (pg/ml). Dxesp: Diferentes grupos de cólicos (1: cólico quirúrgico isquémico. 2: cólico quirúrgico obstructivo simple. 3: Cólico médico obstructivo simple. 4: Grupo control. 5: Cólico médico inflamatorio. Las cajas con letras diferentes denotan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre los grupos.

Transforming growth factor beta 1 peritoneal fluid levels for each colic group and control group. TGF β_1 Lp: Peritoneal fluid transforming growth factor beta-1 levels (pg/mL). Dxesp: Different colic groups (1: Ischemic surgical colic. 2: Obstructive surgical colic. 3: Obstructive medical colic. 4: Control group. 5: Inflammatory medical colic). Boxes with different letters represent significant ($P < 0.05$) differences between groups.

ha observado un aumento significativo en los niveles plasmáticos de TGF- β_1 respecto al grupo control (Hobson y col 2003). Cabe aclarar que en este estudio sólo se incluyeron pacientes equinos que no habían sido sometidos previamente a cualquier cirugía abdominal. Es posible que la principal causa del aumento de los niveles plasmáticos de TGF- β_1 en seres humanos sea la cicatrización peritoneal (Hobson y col 2003) y por esta razón los caballos con cólico del estudio, al no haber recibido cirugía abdominal previa, no presentaron un incremento en los valores plasmáticos de ese factor de crecimiento respecto a los caballos del grupo control.

Un hallazgo importante de este estudio radicó en que los caballos con cólico de los grupos CQI y CMI presentaron niveles peritoneales incrementados de TGF- β_1 (figura 1). Estos resultados revisten gran importancia clínica, ya que este factor de crecimiento es clave en el desarrollo de las adherencias peritoneales (Cheong y col 2001). La producción exagerada de TGF- β_1 altera la capacidad fibrinolítica de la cavidad peritoneal al incrementar la producción de inhibidores de la proteína activadora tisular del plasminógeno (tPA) (Holmdahl y col 2001). Cuando los niveles peritoneales de tPA se ven disminuidos, se reduce la capacidad de degradación de la fibrina, por disminución de los niveles de plasmina. El resultado final es que las adherencias fibrinosas generadas durante una lesión peritoneal (trauma quirúrgico, peritonitis) no son destruidas por la plasmina y progresan hacia adherencias fibrosas (Barton y col 1996, Holmdahl y col 2001, Mueller 2002). A la luz de los hallazgos del presente estudio se podría decir que los caballos afectados por procesos isquémicos intestinales o por procesos inflamatorios de la cavidad abdominal, tales como peritonitis, enteritis anterior o colitis, podrían presentar una mayor predisposición a sufrir adherencias intestinales (cuando son operados) que otros grupos de caballos con cólico. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser comprobada en caballos con adherencias que requieran una relaparotomía exploratoria.

Los resultados de este estudio nos hacen pensar también que es posible que la administración intraperitoneal de anticuerpos contra TGF- β_1 (y posiblemente TGF- β_2) previo a la cirugía de cólicos isquémicos pueda disminuir la presencia de adherencias postoperatorias en el caballo, tal como ha sido observado en un modelo murino de adherencias abdominales (Lucas y col 1996, Gorvy y col 2005). Sin embargo, esta hipótesis también deberá ser comprobada.

Cabe mencionar que la prueba de ELISA empleada para medir los niveles plasmáticos y peritoneales de TGF- β_3 no fue lo suficientemente sensible como para detectar niveles inferiores de 30 pg/ml de este factor de crecimiento. Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico se ha observado en seres humanos que la concentración plasmática de este péptido, así como la del TGF- β_2 es muy baja (< 5%), en comparación con la concentración del TGF- β_1 (Wakefield y col 1995). De manera general, se podría aceptar que los niveles plasmáticos (Carmona y col 2008) y posiblemente

peritoneales de TGF- β_3 se mantienen a una concentración constante, normalmente inferior a 30 pg/ml en caballos sanos y que posiblemente no se ve afectada durante las fases iniciales de cólico. Sin embargo, sería necesario utilizar una prueba más sensible que permita detectar niveles inferiores a 30 pg/ml de este factor de crecimiento (Reinhold y col 2004). El hecho de que tanto algunos pacientes con cólico, así como algunos caballos sanos presentaran niveles plasmáticos y peritoneales incrementados de TGF- β_3 es una situación biológica difícil de explicar. Quizás, tal como sucede en seres humanos, el incremento en los niveles plasmáticos de este péptido se pueda deber a un estado de inmunosupresión (Reinhold y col 2004). Sin embargo, esto no puede ser asegurado en este reporte.

En conclusión, este estudio arroja conocimientos novedosos sobre el comportamiento plasmático y peritoneal de los TGF- β s en la fase prodrómica del cólico equino. Como característica, los niveles peritoneales de TGF- β_1 se encontraron incrementados en los caballos con CQI y CMI (figura 1), quizás como respuesta a la inflamación. Es necesario realizar un trabajo en el que se pueda asociar la presencia de adherencias abdominales con estos dos tipos de cólico. De ser cierta esta hipótesis, el desarrollo de anticuerpos contra TGF- β_1 podría prevenir el desarrollo de adherencias abdominales postoperatorias en el caballo.

RESUMEN

Existe información escasa sobre moléculas presentes en el líquido peritoneal de caballos con cólico relacionadas con el desarrollo potencial de adherencias abdominales. Estudios en especies diferentes correlacionan niveles incrementados de las series del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) con la presencia de adherencias abdominales. Los objetivos de este estudio fueron: 1) documentar y comparar los niveles plasmáticos y del líquido peritoneal del TGF- β_1 y TGF- β_3 en caballos con enfermedad abdominal aguda y en caballos normales. 2) correlacionar los niveles de estos péptidos con los hallazgos del hemograma y los resultados citológicos y bioquímicos del líquido peritoneal. Se tomaron muestras de plasma y líquido peritoneal de 104 caballos con cólico (29 cólicos médicos (15 obstructivos simples y 14 inflamatorios) y 65 cólicos quirúrgicos, de los cuales 30 padecían problemas isquémicos y 35 de problemas obstructivos simples) y de 10 caballos sanos. En cada paciente se realizó un hemograma, análisis citológico de líquido peritoneal y determinación de los niveles plasmáticos y peritoneales de TGF- β_1 y TGF- β_3 mediante ELISA. Los niveles peritoneales de TGF- β_1 fueron estadísticamente más altos en los cólicos quirúrgicos isquémicos y en los cólicos médicos inflamatorios en comparación con los otros tipos de cólicos y con el grupo control. En conclusión, los niveles peritoneales de TGF- β_1 en caballos con crisis abdominal aguda están incrementados como respuesta a la inflamación. Los caballos con lesiones estrangulantes o peritonitis muestran alteración severa en niveles peritoneales de TGF- β_1 .

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a todas las personas de la Unidad Equina del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y a Antoni Iborra, Paz Martínez y Laia Viñals del IBB-UAB, Barcelona, España.

REFERENCIAS

- Argüelles D, JU Carmona, J Pastor, A Iborra, L Viñals, P Martínez, E Bach, M Prades. 2006. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Scien* 81, 237-245.
- Barton MH, C Collatos, JN Moore. 1996. Endotoxin induced expression of tumour necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. *Equine Vet J* 28, 382-389.
- Barton MH, C Collatos. 1999. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J Vet Intern Med* 13, 457-464.
- Carmona JU, D Argüelles, M Prades. 2008. Niveles de factor de crecimiento transformante beta-3 y óxido nítrico en cuatro concentrados autólogos de plaquetas y plasma derivados de sangre equina. *Arch Med Vet* 40, 155-160.
- Chegini N, K Kotseos, Y Zhao, B Bennett, FW McLean, MP Diamond, L Holmdahl, J Burns. 2001. Differential expression of TGF-beta1 and TGF-beta3 in serosal tissues of human intraperitoneal organs and peritoneal adhesions. *Hum Reprod* 16, 1291-1300.
- Cheong YC, SM Laird, TC Li, JB Shelton, WL Ledger, ID Cooke. 2001. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Hum Reprod Update* 7, 556-566.
- Dawson-Saunders B, RG Trapp. 1993. *Bioestadística médica*. 1ª ed. Dawson-Saunders B, Trapp RG (eds). Editorial Manual Moderno, México DF, México.
- Delesalle C, J Dewulf, RA Lefebvre, JA Schuurkes, J Proot, L Lefere, P Deprez. 2007. Determination of lactate concentrations in blood plasma and peritoneal fluid in horses with colic by an Accusport analyzer. *J Vet Intern Med* 21, 293-301.
- Estepa JC, I Lopez, R Mayer-Valor, M Rodríguez, E Aguilera-Tejero. 2006. The influence of anticoagulants on the measurement of total protein concentration in equine peritoneal fluid. *Res Vet Sci* 80, 5-10.
- Ferguson MW, S O'Kane. 2004. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 839-850.
- Freeman ML, GM Saed, EF Elharmady, MP Diamond. 2003. Expression of transforming growth factor beta isoform mRNA in injured peritoneum that healed with adhesions and without adhesions and in uninjured peritoneum. *Fertil Steril* 80 Suppl 2, 708-713.
- Ghella AM, AF Stucchi, N Chegini, C Ma, CD Andry, JM Kaseta, JW Burns, KC Skinner, JM Becker. 2000. Role of transforming growth factor beta-1 in peritonitis-induced adhesions. *J Gastrointest Surg* 4, 316-323.
- Gorvy DA, SE Herrick, M Shah, MW Ferguson. 2005. Experimental manipulation of transforming growth factor-beta isoforms significantly affects adhesion formation in a murine surgical model. *Am J Pathol* 167, 1005-1019.
- Gorvy DA, G Barrie Edwards, CJ Proudman. 2008. Intra-abdominal adhesions in horses: a retrospective evaluation of repeat laparotomy in 99 horses with acute gastrointestinal disease. *Vet J* 175, 194-201.
- Grulke S, T Franck, M Gangl, F Péters, A Salciccia, G Deby-Dupont, D Serteyn. 2008. Myeloperoxidase assay in plasma and peritoneal fluid of horses with gastrointestinal disease. *Can J Vet Res* 72, 37-42.
- Hobson KG, M DeWing, HS Ho, BM Wolfe, K Cho, DG Greenhalgh. 2003. Expression of transforming growth factor beta1 in patients with and without previous abdominal surgery. *Arch Surg* 138, 1249-1252.
- Holmdahl L, K Kotseos, M Bergström, P Falk, ML Ivarsson, N Chegini. 2001. Overproduction of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) is associated with adhesion formation and peritoneal fibrinolytic impairment. *Surgery* 129, 626-632.
- Javelaud D, A Mauviel. 2004. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Intern J Biochem Cell Biol* 36, 1161-1165.
- Krause TJ, D Katz, CJ Wheeler, S Ebner, RD McKinnon. 1999. Increased levels of surgical adhesions in TGF beta1 heterozygous mice. *J Invest Surg* 12, 31-38.
- Latson KM, JE Nieto, PM Beldomenico, JR Snyder. 2005. Evaluation of peritoneal fluid lactate as a marker of intestinal ischaemia in equine colic. *Equine Vet J* 37, 342-346.
- Lucas PA, DJ Warejcka, HE Young, BY Lee. 1996. Formation of abdominal adhesions is inhibited by antibodies to transforming growth factor-beta1. *J Surg Res* 65, 135-138.
- Mair TS, MH Hillyer, FG Taylor. 1990. Peritonitis in adult horses: a review of 21 cases. *Vet Rec* 126, 567-570.
- Mair TS, LJ Smith. 2005. Survival and complication rates in 300 horses undergoing surgical treatment of colic. Part 3: Long-term complications and survival. *Equine Vet J* 37, 310-314.
- Matthews S, AJ Dart, SW Reid, BA Dowling, DR Hodgson. 2002. Predictive values, sensitivity and specificity of abdominal fluid variables in determining the need for surgery in horses with an acute abdominal crisis. *Aust Vet J* 80, 132-136.
- Mueller PE. 2002. Advances in prevention and treatment of intra-abdominal adhesions in horses. *Clin Tech Equine Pract* 1, 163-173.
- Muñoz E, D Argüelles, L Areste, LS Miguel, M Prades. 2008. Retrospective analysis of exploratory laparotomies in 192 Andalusian horses and 276 horses of other breeds. *Vet Rec* 162, 303-306.
- Nieto JE, BM Aldridge, PM Beldomenico, M Aleman, JR Snyder. 2005. Characterization of equine intestinal fatty acid binding protein and its use in managing horses with colic. *Am J Vet Res* 66, 223-232.
- Penha-Goncalves MN, DE Onions, L Nicolson. 1997. Cloning and sequencing of equine transforming growth factor beta 1 (TGF-b1) cDNA. *DNA Sequence* 7, 375-378.
- Phillips TJ, JP Walmsley. 1993. Retrospective analysis of the results of 151 exploratory laparotomies in horses with gastrointestinal disease. *Equine Vet J* 25, 427-431.
- Reinhold D, E Perlov, K Schrecke, J Kekow, T Brune, M Sailer. 2004. Increased blood plasma concentrations of TGF-beta isoforms after treatment with intravenous immunoglobulins (i.v.IG) in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 152, 191-194.
- Rout UK, GM Saed, MP Diamond. 2005. Expression pattern and regulation of genes differ between fibroblasts of adhesion and normal human peritoneum. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 1.
- Saulez MN, CK Cebra, SJ Tornquist. 2004. The diagnostic and prognostic value of alkaline phosphatase activity in serum and peritoneal fluid from horses with acute colic. *J Vet Intern Med* 18, 564-567.
- Schiller M, D Javelaud, A Mauviel. 2004. TGF-β induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 35, 83-92.
- Singer ER, MA Livesey. 1997. Evaluation of exploratory laparotomy in young horses: 102 cases (1987-1992). *J Am Vet Med Assoc* 211, 1158-1162.
- Thrall MA. 2006. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Thrall MA (ed). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Theoret CL, SM Barber, TN Moyana, JR Gordon. 2001. Expression of transforming growth factor beta(1), beta(3), and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 30, 269-277.
- Theoret CL, SM Barber, TN Moyana, JR Gordon. 2002. Preliminary observations on expression of transforming growth factors beta1 and beta3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* 31, 266-273.
- Wakefield LM, JJ Letterio, T Chen, D Danielpour, RS Allison, LH Pai, AM Denicoff, MH Noone, KH Cowan, JA O'Shaughnessy, MB Sporn. 1995. Transforming growth factor-beta1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 1, 129-136.