

Evaluación de cinco protocolos estándar para la obtención de plasma rico en plaquetas en caninos

Evaluation of five standard protocols for the obtention of canine platelet rich plasma

Avaliação de cinco protocolos-padrão para obter plasma rico em plaquetas em caninos

Pablo Antonio Fariña Sirandoni, MVZ_{1,2}
Rodrigo Ambrosio Pulgar Aguila, MVZ₂
Alejandro Ignacio Molina Cofré, MVZ₂

Recibido: 1 de noviembre de 2019

Aprobado: 10 de diciembre de 2019

Publicado: 15 de febrero de 2020

Cómo citar este artículo:

Fariña-Sirandoni PA, Pulgar Aguila RA, Molina-Cofré AI. Evaluación de cinco protocolos estándar para la obtención de plasma rico en plaquetas en caninos.

Spei Domus. 2019;15(30-31): 1-16.

doi: <https://doi.org/10.16925/2382-4247.2020.01.03>

Artículo de investigación. <https://doi.org/10.16925/2382-4247.2020.01.03>

¹ Profesor asociado Universidad Santo Tomás, Santiago de Chile. Av. Ejército Libertador 147, Teléfono: +56227451624.

Correo electrónico: pablofarina@santotomas.cl

² Escuela de Medicina Veterinaria, facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Chile

Resumen

Introducción: el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) ha tomado gran importancia durante los últimos años, lo que ha demostrado su utilidad en el tratamiento de algunas patologías. Por otra parte, no se encuentra adecuada información sobre los procesos más eficientes de obtención, que garanticen la concentración mínima deseada para los propósitos terapéuticos. Este estudio comparó cinco protocolos conocidos de obtención de PRP y estableció el mejor rendimiento para determinar qué protocolo de PRP ofrece el mayor número de plaquetas con los implementos de uso corriente en la clínica.

Metodología: se compararon cinco protocolos estándar clásicos recomendados por la literatura internacional, por su capacidad de lograr altas concentraciones de plaquetas. Se utilizó sangre de caninos con un hemograma normal para evaluar cada protocolo, vía conteo del PRP de cada uno de ellos.

Resultados: se realizó conteo plaquetario y se encontró en un 163 % para el protocolo C, seguido por protocolo B, E, D y A con un 96 %, 8,62 %, 6,38 % y 4,47 %, respectivamente.

Conclusiones: existe variabilidad de concentración de plaquetas entre los diferentes protocolos, en este caso, el protocolo C dio mejores resultados, siendo el que demanda un número menor de revoluciones y tiempo para la obtención de PRP.

Palabras clave: plasma rico en plaquetas, factores de crecimiento, protocolos de PRP, aplicaciones del PRP.

Abstract

Introduction: platelet rich plasma (PRP) usage has acquired great relevance within the last few years, which has demonstrated its usefulness in the treatment of some pathologies. Up until now, there is not enough information on efficient obtention processes that warrants a wished minimal concentration for therapeutical purposes. This study compared five known protocols for PRP obtention and established the best performance to determine which protocol offers the greatest number of platelets with common resources within the clinic.

Methodology: five standard protocols recommended by international literature were compared by its capacity to accomplish larger amounts of platelets. Canine blood with a normal hemogram was used to evaluate each protocol by counting each PRP number.

Results: a platelet count was carried out and it was found that 163% for protocol C, followed by protocol B, E, D and A with 96%, 8.62%, 6.38% and 4.47%, respectively.

Conclusions: there is a great variability between platelet count within each protocol. In this case, protocol C gave the best result, being the one that demands more revolutions and time for the obtention of PRP.

Keywords: platelet rich plasma, growth factor, PRP protocols, PRP applications.

Resumo

Introdução: o uso de plasma rico em plaquetas (PRP) vem ganhando importância nos últimos anos, o que demonstra sua utilidade no tratamento de algumas patologias. Contudo, não se encontra adequada informação sobre os processos mais eficientes para obtê-lo que garantam a concentração mínima desejada para os fins terapêuticos. Este estudo comparou cinco protocolos conhecidos de obtenção de PRP e estabeleceu o melhor desempenho para determinar qual protocolo de PRP oferece o maior número de plaquetas com os implementos de uso comum na clínica.

Metodologia: foram comparados cinco protocolos-padrão clássicos recomendados pela literatura internacional, por sua capacidade de atingir altas concentrações de plaquetas. Foi utilizado sangue de caninos com um hemograma normal para avaliar cada protocolo, via contagem de PRP de cada um deles.

Resultados: foi realizada contagem plaquetária e foi verificado em 163 % para o protocolo C, seguido por protocolo B, E, D e A com 96 %, 8,62 %, 6,38 % e 4,47 %, respectivamente.

Conclusões: existe variabilidade de concentração de plaquetas entre os diferentes protocolos, nesse caso, o protocolo C apresentou melhores resultados, sendo o que demanda menor número de revoluções e tempo para obter PRP.

Palavras-chaves: plasma rico em plaquetas, fatores de crescimento, protocolos de PRP, aplicações do PRP.

Introducción

El uso de plasma rico en plaquetas (PRP) ha tomado gran importancia durante los últimos años, ya que ha demostrado ser útil para el tratamiento de distintas patologías. Es así como Mendieta *et al.* [1], Radice *et al.* [2] y Alanis *et al.* [3] señalan su beneficio utilizando distintos protocolos, sin embargo, muchos de estos trabajos no confirman que la obtención de este haya logrado la cantidad mínima de plaquetas esperada. Es por esto que es relevante evaluar distintos protocolos de obtención.

Las plaquetas provienen de los megacariocitos, que proliferan y maduran en la médula ósea, bajo la acción de la trombopoyetina. Su citoplasma está compuesto por partículas de glucógeno que constituyen su fuente energética y contiene muy pocos ribosomas, lo que ratifica su escasa capacidad de síntesis proteica. Por otro lado, su citoesqueleto corresponde a un gel viscoelástico que cumple las funciones de regular el contorno y estabilidad de la membrana, mediar la distribución espacial de las glicoproteínas receptoras presentes en la membrana y constituir una barrera para la exocitosis.

Los valores normales en sangre periférica de caninos oscilan entre 10-12 plaquetas por campo de inmersión (objetivo 100x) y los recuentos plaquetarios circulantes son de 200.000 a 600.000 plaquetas/ μ l [4].

El PRP se define como un producto biológico autólogo derivado de la sangre, en el cual a través de un proceso de centrifugado se obtiene una fracción plasmática con una concentración de plaquetas por sobre la línea basal. Es una forma de coágulo autólogo que contiene un número favorable elevado de plaquetas y presenta un pH aproximadamente de 6,6 [5]. Además, al provenir de la misma sangre del paciente, está libre de enfermedades transmisibles y no causa reacciones adversas de hipersensibilidad.

El PRP tiene abundantes factores de crecimiento, entre los más importantes encontramos factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento epitelial y factor de crecimiento de fibroblastos.

El PRP se ha utilizado en distintas áreas de la medicina, tales como cirurgías orales, ortopédicas, en lesiones tendinosas, gastroenterología y oftalmología, entre otras.

Plaquetas

Origen

Las plaquetas provienen de los megacariocitos, que proliferan y maduran en la médula ósea, bajo la acción de la trombopoyetina. La fragmentación de su citoplasma da origen a las plaquetas y estas, a su vez, corresponden a los elementos figurados más pequeños de la sangre. Su vida media es de 6 a 12 días [6].

Morfología

Las plaquetas de los mamíferos son pequeños fragmentos anucleares y discoides de los megacariocitos. Como media miden 3-5 μm de diámetro en la mayoría de las especies y tienen finos gránulos rojizos.

Las plaquetas tienen una membrana con una bicapa de fosfolípidos que contienen glucoproteínas transmembrana y periféricas. Estas glucoproteínas sirven de receptores para la activación, adhesión y coagulación.

La forma de las plaquetas se mantiene por la espiral de microtúbulos submembranosos y un sistema contráctil compuesto principalmente de filamentos de actina y miosina [7].

Su citoplasma está compuesto por partículas de glucógeno que constituyen su fuente energética, contiene muy pocos ribosomas, lo que ratifica su escasa capacidad de síntesis proteica. Por otro lado, su citoesqueleto corresponde a un gel viscoelástico que cumple las funciones de regular el contorno y estabilidad de la membrana, mediar la distribución espacial de las glicoproteínas receptoras presentes en la membrana y constituir una barrera para la exocitosis [8].

Función

Las plaquetas son las responsables de mantener la hemostasis normal y para ello llevan a cabo cuatro funciones diferentes: mantener la integridad vascular al sellar pequeñas discontinuidades endoteliales, detener hemorragias por medio de la agregación plaquetaria tras la constricción endotelial, contribuir a la actividad procoagulante

de membrana lipídica, al facilitar la hemostasis secundaria y la formación de fibrina, y promover la reparación vascular mediante el factor de crecimiento derivado de las plaquetas [9].

Las plaquetas mantienen una función fisiológica fundamental con el inicio de un tapón plaquetario y la preservación de la integridad vascular, así ayudan a prevenir la pérdida de sangre en sitios de lesión vascular, para esto se adhieren y se agregan formando una superficie procoagulante que conduce a la generación de trombina y la formación de fibrina, gracias a que son portadoras de proteínas que participan en la reparación y regeneración tisular de las heridas, puesto que son las encargadas de secretar los factores de crecimiento, que a su vez producirán quimiotaxis, proliferación y diferenciación tisular, neovascularización y producción de matriz extracelular [10].

Recuento normal

Los valores normales en caninos oscilan entre 10-12 plaquetas por campo de inmersión (objetivo 100x) y los recuentos plaquetarios circulantes son de 200.000 a 600.000 plaquetas/ μ l en sangre periférica [4].

Plasma rico en plaquetas

Características generales

El PRP es un producto biológico autólogo derivado de la sangre que se obtiene por medio de centrifugaciones, una fracción plasmática con una concentración de plaquetas por sobre la línea basal y presenta un pH aproximadamente de 6,6.

Además, al provenir de la misma sangre del paciente, está libre de enfermedades transmisibles y no causa reacciones adversas de hipersensibilidad [5].

Ferraz *et al.* [11] señalan que para que el plasma rico en plaquetas sea funcional, lo recomendable es que contenga una concentración que oscile entre 550.000 a 1.000.000 de plaquetas/ μ l. Sin embargo, Anitua *et al.* [9] destacan que una concentración de 300.000 plaquetas/ μ l sería suficiente para producir un efecto terapéutico óptimo.

El concentrado plaquetario contiene una gran cantidad de factores de crecimiento, derivadas de las plaquetas activadas y están involucrados en la mayoría de los procesos de remodelación del organismo [2].

Principales factores de crecimiento

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos por un mecanismo de quimiotaxis. Corresponde a un activador de los macrófagos, facilita la formación del colágeno tipo I y, en injurias óseas, es secretado por las plaquetas durante las fases iniciales de curación de una fractura [1].

Factor de crecimiento transformante (TGF)

El TGF- β interviene modulando la síntesis de la matriz ósea por varios mecanismos, incluyendo el incremento en el número de células capaces de expresar el genotipo de los osteoblastos, así como actuar directamente sobre los osteoblastos diferenciados. También es capaz de disminuir la resorción ósea al inducir la apoptosis de los osteoclastos [12].

Está involucrado directa o indirectamente en procesos como la cicatrización, angiogénesis, hematopoyesis, desarrollo de las glándulas mamarias, metabolismo óseo y formación de piel, así como en múltiples patologías como enfermedades inflamatorias y fibróticas y el desarrollo de tumores [13].

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Aumenta la angiogénesis y permeabilidad vascular, estimulando la mitogénesis de células endoteliales [3].

Se ha visto que el VEGF juega un papel importante en la osificación endocondral mediante el acoplamiento de la angiogénesis con la remodelación hipertrófica del cartílago y formación de hueso. En cultivos de cartílago se ha visto que los condrocitos expresan VEGF y sus receptores, los cuales no se encuentran en el cartílago articular maduro. Sin embargo, estas proteínas se han encontrado expresadas en el cartílago articular artrósico humano, por lo que se ha sugerido una correlación positiva entre esta proteína y la destrucción del cartílago articular y desarrollo de la osteoartritis [14].

Factor de crecimiento insulínico (IGF)

La síntesis de IGF se realiza mayoritariamente en el hígado, de donde se libera al torrente sanguíneo, y es capturado por las plaquetas mediante un mecanismo de endocitosis, para ser posteriormente almacenado en los gránulos alfa [15].

En estudios con animales se ha demostrado que el IGF-I mejora la cicatrización de lesiones musculares. Este factor produce numerosos efectos estimulantes del crecimiento, entre los que destacan efectos mitogénicos y la promoción de la sulfatación del cartílago. Así mismo, actúa como mediador de las acciones estimulantes del crecimiento en el esqueleto y otros órganos desencadenados por la hormona de crecimiento [16], [17].

Factor de crecimiento epitelial (EGF)

Es mitógeno, proapoptótico y quimiotáxico. También participa en la diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos [18].

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Contribuye a la angiogénesis en el tejido granulado, esto estimula la infiltración y proliferación de células endoteliales [19]. Es capaz de promover la proliferación y diferenciación de los condrocitos tanto *in vitro* como *in vivo*. En varios modelos experimentales de defectos de cartílago, la aplicación de FGF aceleró la formación de cartílago sobre la superficie articular, lo que mejoró las propiedades biomecánicas, así como la formación de hueso [20], [21], [22].

Aplicaciones de PRP

Cirugía oral y maxilofacial

Uno de los objetivos de la terapia periodontal es la regeneración de hueso, cemento y ligamento periodontal. Estos procesos son regulados por proteínas de adherencia, así como por la acción de factores de crecimiento.

Se ha estudiado que, para facilitar la formación e inserción de tejido conjuntivo, se debe realizar raspado y alisado radicular durante la terapia, ya que se ha visto que en la porción radicular existen endotoxinas bacterianas, las cuales no permiten la inserción o crecimiento de fibroblastos [23].

Cirugía ortopédica

El uso de PRP en cirugía ortopédica y traumatología ha demostrado tener el efecto clínico esperado. Este concentrado plaquetario se ha utilizado en cirugía protésica de rodilla, fracturas de cadera y rodilla [24].

Este potencial osteoinductor se ha empleado en pacientes sometidos a fusiones vertebrales, y ha mostrado en su aplicación una mayor capacidad de regeneración ósea alrededor de los implantes de titanio. Este efecto se debe a que la liberación de factores de crecimiento por las plaquetas tiene un efecto quimiotáctico y mitogénico sobre las células mesenquimales y osteoblastos, acelerando la cicatrización ósea [25].

PRP en lesiones tendinosas

Además de la aplicación en lesiones óseas, a lo largo de estos años, se ha podido comprobar su aplicación en la restauración de otros tejidos, como la regeneración de las roturas tendinosas; este es un proceso lento debido al poco aporte sanguíneo de las células. Con su acción se reduce el proceso inflamatorio y se acorta el periodo de reparación, por lo que se acorta el tiempo de inmovilización y se alcanza una funcionalidad óptima más temprana [26].

Gastroenterología

Las plaquetas son una fuente rica de factores pro y antiangiogénicos, y son la primera célula en acumularse en el sitio de la lesión. La aplicación de PRP vía oral acelera la cicatrización de úlceras gástricas a través de la presencia del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual induce la angiogénesis mediante la estimulación de la proliferación endotelial y la migración [27].

Oftalmología

En esta área el uso de plasma rico en plaquetas da una mayor respuesta celular proliferativa en la curación de heridas retinianas [28].

En pacientes con queratoconjuntivitis seca, se observó que el uso de plasma rico en plaquetas producía una mejoría significativa en la sintomatología de esta patología [29].

Es por esto que el principal objetivo de este trabajo fue comparar cinco protocolos de obtención de PRP, para determinar cuál es elegible para el hospital clínico veterinario de la Universidad Santo Tomás Santiago de Chile.

Materiales y método

Se utilizaron cinco caninos de diferentes edades, raza y sexo, que presentaron un hemograma dentro de parámetros de normalidad, realizado en el hospital clínico veterinario de la Universidad Santo Tomás de Santiago de Chile.

A cada paciente se le instaló un catéter de 22G en la vena cefálica y luego con una jeringa de 3 ml se le extrajeron 2 ml de sangre, la cual fue depositada en tubos con citrato de sodio al 3,8 % y se realizó el recuento plaquetario inicial.

Posteriormente, previo a cada toma de muestra para los distintos protocolos, se realizó un lavado de catéter (*flushing*) utilizando 2 ml de solución salina al 4,5 %, para dejar la vía permeable. Luego se extrajeron 3 ml de sangre los cuales fueron desechados (para evitar la hemodilución). Finalmente se extrajeron otros 2 ml de sangre a cada canino, a los cuales se le realizó el recuento plaquetario para cada protocolo (total 5 extracciones por ejemplar: protocolos A, B, C, D y E).

Una vez obtenida la muestra, se homogenizó 10 veces y se llevó inmediatamente al laboratorio para aplicar cada protocolo, los cuales fueron elegidos por ser los más eficientes según la revisión bibliográfica realizada.

El protocolo A: 3000 rpm/4 minutos la primera centrifugación y la segunda centrifugación a 3000 rpm/13 minutos [30].

El protocolo B: 1200 rpm/8 minutos las dos centrifugaciones [31].

El protocolo C: 1000 rpm/8 minutos solo una centrifugación [32].

El protocolo D: 1500 rpm/10 minutos la primera centrifugación y a 2000 rpm/20 minutos la segunda centrifugación [33].

El protocolo E: 2000 rpm/10 minutos las dos centrifugaciones [34].

Una vez obtenidos los plasmas resultantes de cada protocolo, fueron divididos en tres partes equivalentes, donde se eliminaron las dos terceras partes superiores. El tercio restante fue analizado para el conteo de plaquetas a través del equipo Mythic 18 vet®. Los valores se expresaron en número de plaquetas por micro litro (miles/uL).

Para el análisis de los datos se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Además, se calculó el porcentaje de variación de cada método con relación a la concentración inicial de plaquetas.

Resultados y discusión

El mayor número de plaquetas contabilizado fue obtenido con el protocolo C, 496200/uL lo que representa un 63,3 % más que el conteo promedio inicial, seguido por el protocolo B (291800/uL), que logro un 3,9 % menos, luego el protocolo E, D y A con un conteo promedio de 26400/uL, 19400/uL y 17000/uL respectivamente (ver tabla 1).

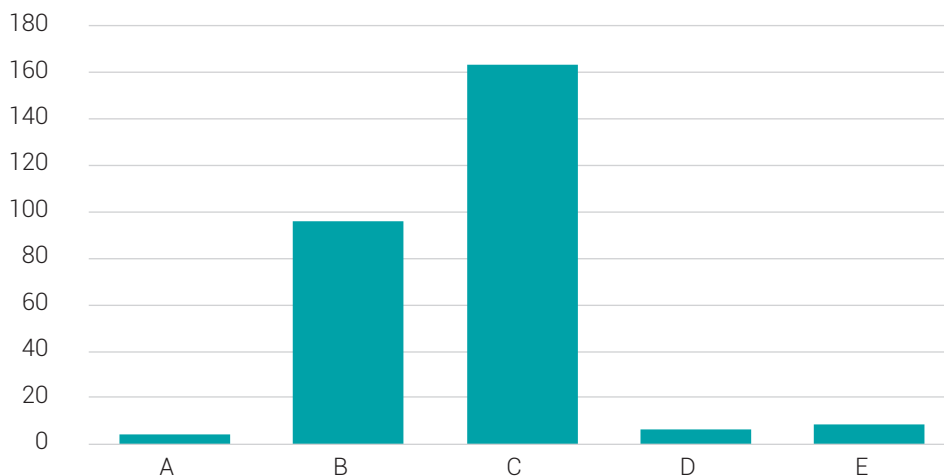
Tabla 1. Cantidad de plaquetas por ul, según ejemplar y protocolo utilizado

Paciente	Conteo Inicial	PROTOCOLO				
		A	B	C	D	E
Canino 1	214.000	*	386.000	441.000	59.000	12.000
Canino 2	203.000	25.000	159.000	350.000	16.000	6.000
Canino 3	336.000	11.000	497.000	504.000	1.000	52.000
Canino 4	428.000	19.000	250.000	780.000	11.000	42.000
Canino 5	338.000	13.000	167.000	406.000	10.000	20.000
Promedio	303.800	17.000	291.800	496.200	19.400	26.400
% de variación	100%	95,5	3,9	63,3	93,6	91,3

*: Muestra coagulada.

Fuente: elaboración propia

Al comparar los protocolos en relación con los valores promedios de las concentraciones de plaquetas, se muestra una similitud entre los protocolos A, D y E, como a su vez una diferencia entre los protocolos A y C, siendo este último diferente entre todos los protocolos, como también el protocolo B. Además, dentro de los protocolos, el único que sobrepasa la concentración deseada de 300.000/uL, según Anitua *et al.* [9], es el protocolo C.

**Figura 1.** Porcentaje de recuperación de plaquetas según protocolo utilizado en el estudio.

Fuente: elaboración propia

La desviación estándar muestra que los protocolos B y C presentan las mayores desviaciones con valores de 146.576 y 168.196, respectivamente; mientras que el protocolo A presenta la menor desviación con un valor de 6.324; siguiéndole los

protocolos D y E, con valores de 22.788 y 19.768, respectivamente, lo que indicaría una mayor variabilidad en B y C (tabla 2). Sin embargo, el CV indica que, el protocolo C presentó los datos más homogéneos con un valor de 33,9 % a diferencia de los protocolos A, B, D y E que presentan heterogeneidad, con valores de 46,5 %, 50,2 %, 117,5 % y 74,9 %, respectivamente, siendo el protocolo D el más heterogéneo (tabla 2).

Tabla 2. Desvío estándar (d.s) y coeficiente de variación (C.V.) de los protocolos evaluados

	Inicio	A	B	C	D	E
d.s	94.679	6.324	146.576	168.196	22.788	19.768
C.V.	31,2	46,5	50,2	33,9	117,5	74,9

El recuento plaquetario debería ser uno de los factores claves para estandarizar los estudios que investigan la capacidad regenerativa de PRP [35].

Aunque desde el puro concepto de la hematología se ha comprobado que el ácido citrato dextrosa produce una mejor estabilidad de los parámetros de activación plaquetaria en el tiempo, en comparación con el citrato de sodio, desde el punto de vista de la medicina regenerativa, se podría pensar que el uso de uno u otro de los anticoagulantes evaluados no representa una ventaja clínica aparente [36].

Referente a la centrifugación, es importante considerar la velocidad de centrifugación que va en relación directa con la fuerza de gravedad, ya que se ha visto que una fuerza excesiva reduce drásticamente la concentración 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, y así se liberan los factores de crecimiento prematuramente, esto conlleva una pérdida de plaquetas [37], [38], lo que explicaría el bajo recuento de plaquetas obtenidos por los protocolos A, D y E mostrados en la figura 1.

El protocolo D fue uno de los que obtuvo un bajo rendimiento, el cual corresponde a un protocolo para equinos, en donde se describe que para lograr una concentración importante de plaquetas en caballos y vacas mediante métodos manuales es necesario realizar dos centrifugaciones y una mayor fuerza de centrifugación para obtener un plasma rico en plaquetas [39], lo cual podría no ser igual, al menos en este estudio para caninos, en donde con una centrifugación simple se obtienen plaquetas suficientes para tener un efecto terapéutico [40] como ocurrió en el protocolo C.

Wiethuchter *et al.* [41] menciona que la obtención de PRP en humanos es distinta a la de caninos, y utiliza las recomendaciones para el proceso en personas, por lo

que no se deberían extrapolar los protocolos, esto podría explicar que los protocolos A y B no llegaran a los valores esperados.

Si los resultados obtenidos en las investigaciones son diferentes, es lógico pensar que esto puede estar influenciado por el uso de distintos dispositivos y equipos de evaluación, y de distintos protocolos de obtención de PRP. Es necesario entender que el verdadero PRP es obtenido con máquinas calificadas para tal fin; dispositivos en mal estado pueden alterar las proporciones y la calidad del PRP y su beneficio no será el mismo, si se compara con el obtenido por una centrifuga certificada [42].

Conclusión

Existe variabilidad de concentración de plaquetas entre los diferentes protocolos, dado que en este caso el protocolo C dio mejores resultados, siendo el que demanda un número menor de revoluciones y tiempo para la obtención de PRP.

Se recomienda utilizar el protocolo C para obtener PRP con la centrifuga Mythic 18 vet®, por lo que cada centro veterinario debería elaborar su propio protocolo para la obtención de este hemoderivado.

Referencias

- [1] Mendieta T, Alvarado J, Negrete J. Utilidad del plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento en defectos óseos, experiencia en el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos del ISSSTE. *Acta Ortop Mex.* 2007;21(5):256-60.
- [2] Radice F, Yáñez R, Gutiérrez V, Pinedo M, Rosales, J, Coda S. Uso de concentrado autologo rico en factores de crecimiento en la reconstrucción del LCA. *Rev Argent Artrosc.* 2008;14:31-40.
- [3] Alanis L, Zamora P, Cruz A. Uso de plasma rico en plaquetas en el tratamiento de las lesiones meniscales. Reporte de dos casos. In *Anales Médicos.* 2010;55(3):147-53.
- [4] Rebar A H. *Manual de hematología de perros y gatos.* Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias; 2002. 288p.
- [5] Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4), 225-28.

- [6] Pulido I, Sunyer I. Transfusiones de sangre en la clínica de pequeños animales. *Clínica Veterinaria Pequeños Animales*. 2003;23(3):149-54.
- [7] Latimer K, Prasse KW, Mahaffey EA. *Patología clínico veterinaria*. Barcelona: Multimédica; 2005. 558p.
- [8] García M, Coma C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*. 2000;1(2):132-41.
- [9] Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2004;91(1):4-15. doi: 10.1160/TH03-07-0440
- [10] Gómez B, De Bengoa Vallejo RB, Iglesias M, Gómez RS. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). *Revista Internacional Ciencias Podológicas*. 2007;1(1):7-10.
- [11] Ferraz V, Ferrigno C, Schmaedecke A. Platelet concentration of platelet-rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2007;44(6):435-40. doi: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26609>
- [12] Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 2004;13(4):301-9. doi: 10.1097/01.id.0000148555.91063.06
- [13] Bierie B, Moses HL. TGF-beta and Cancer. 2006;17(1-2):29-40. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.006
- [14] Lingaraj K, Poh CK, Wang W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during articular cartilage growth and re-expressed in osteoarthritis. *Ann Acad Med Singapore*. 2010;39(5):399-403.
- [15] Duan C. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J Endocrinol*. 2002;175(1):41-54. doi: 10.1677/joe.0.1750041
- [16] Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH *et al*. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82(1):131-7. doi: 10.1302/0301-620x.82b1.8954
- [17] Trejo JL, Piriz J, Llorens-Martin MV, Fernández AM, Bolos M, LeRoith *et al*. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry*. 2007;12(12):1118-28. doi: 10.1038/sj.mp.4002076

- [18] Schwartz A, Martínez-Sánchez G, Re L. Factores de crecimiento derivados de plaquetas y sus aplicaciones en medicina regenerativa. Potencialidades del uso del ozono como activador. *Revista Española Ozonoterapia*. 2011;1(1):54-73.
- [19] Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg*. 2003;90(2):133-46. doi: 10.1002/bjs.4019
- [20] Chuma H, Mizuta H, Kudo S, Takagi K, Hiraki Y. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(10):834-42. doi: 10.1016/j.joca.2004.07.003
- [21] Fukuda A, Kato K, Hasegawa M, Hirata H, Sudo A, Okazaki K *et al*. Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*. 2005;26(20):4301-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.007.
- [22] Gaissmaier C, Koh JL, Weise K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*. 2008;39 Suppl 1:S88-96. doi: 10.1016/j.injury.2008.01.035
- [23] Moreno L, Marín G, Enríquez F, González J, Moreno LV, Cisneros L, De la Sancha. Utilización de plasma rico en plaquetas para regeneración periodontal en un perro. *Revista Odontológica Mexicana*, 2004;8(3):64-69.
- [24] Ahmad Z, Howard D, Brooks RA, Wardale J, Henson F, Getgood A, Rushton N. The role of platelet rich plasma in musculoskeletal science. *JRSM short reports*; 2012;3(6):1-9. doi: 10.1258/shorts.2011.01 1148
- [25] Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone*. 1999;25(2 Suppl):47S-50S. doi: 10.1016/s8756-3282(99)00132-5
- [26] Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andía I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(10):1648-52. doi: 10.1249/01.MSS.0000089344.44434.50
- [27] Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Dudar GK. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor. *Br J Pharmacol*. 2006;148(3):274-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0706722
- [28] Cullinane AB, O'Callaghan P, McDermott K, Keohane C, Cleary PE. Effects of autologous platelet concentrate and serum on retinal wound healing in an animal model. *Graefe's Archive Clinical Experimental Ophthalmology*. 2002;240(1):35-41. doi: 10.1007/s00417-001-0397-z

- [29] Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodríguez A, Artola A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res.* 2007;39(3):124-9. doi: 10.1159/000100933
- [30] Flores JR, Gallego MAP, García-Denche JT. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.* 2012;34(1):8-17.
- [31] Valadez-Báez XL, Hernández-Santos JR, Torres-Huerta JC, Tenopala- Villegas S, Canseco-Aguilar CP. Método óptimo para la obtención de plasma rico en plaquetas en el Servicio de Clínica del Dolor del CMN 20 de noviembre ISSSTE. *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 2016;23(4):175-180. doi:http://dx.doi.org/10.20986/resed.2016.3419/2016
- [32] Fernández-Delgado N, Hernández-Ramírez P, Forrellat-Barrios M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2012;28(3):200-216.
- [33] Manzano AF, del Arco MV, Llorente IS. Factores de crecimiento plaquetarios en el tratamiento de la tendinitis del tendón flexor digital superficial de un caballo de carreras. *Revista Complutense Ciencias Veterinarias.* 2009;3(2):253.
- [34] Ceccarelli C. Evaluación de un método de doble centrifugación para la preparación de concentrado autólogo de plaquetas (APC) en caninos. [Tesis para optar al título de médico veterinario]. [Santiago, Chile]. Universidad Santo Tomás; 2013.
- [35] Nagata MJ, Messori MR, Furlaneto FA, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG *et al.* Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent.* 2010;4(4):395-402.
- [36] Giraldo CE, López C, Carmona JU. Efectos de dos anticoagulantes sobre el recuento celular y parámetros de activación plaquetaria de plasma rico en plaquetas de equinos. *Arch Med Vet.* 2015;47(3):341-346. doi: http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2015000300011
- [37] Reyes M, Montero S, Cifuentes J, Zarzar E. Actualización de la técnica de obtención y uso del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). *Rev Dent Chile.* 2002;93(2):25-8.
- [38] Kieb M, Sander F, Prinz C, Adam S, Mau-Möller A, Bader R *et al.* Platelet-rich plasma powder: a new preparation method for the standardization of growth factor concentrations. *Am J Sports Med.* 2017;45(4):954-960. doi: 10.1177/0363546 516674475

- [39] 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(2):109-115. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2012000200003>
- [40] Silva RF, Rezende CMF, Paes-Leme, FO, Carmona JU. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. Arch Med Vet. 2011;43(1):95-98.
- [41] Wiethuchter CF, Troncoso IT, Luzio Á, Opazo Á, Rios C, Parra JP, Villarroel MC. Comparación de la concentración de factores de crecimiento transformante beta I, mediante 2 métodos de obtención de sangre en perros clínicamente sanos. REDVET. Revista Electrónica Veterinaria. 2017;18(11):1-9.
- [42] Marx R, Garg A. The biology of platelets and the mechanism of platelet-rich plasma. En: Marx R, Garg A, editores. Dental and Craniofacial Applications of Platelet-Rich Plasma. Chicago: Quintessence, 2005. p. 3-30.