

Concentración de plaquetas en pacientes felinos sanos a diferentes velocidades de centrifugación en la Ciudad de Bogotá, Colombia

**Margarita Pinto Rodríguez
Luisa Alejandra Triana Rodríguez**



**Tutor:
Dr. Juan Carlos Morales Pérez. Z, Mv, Esp, MSc (c)**

**Universidad Antonio Nariño
Medicina Veterinaria
Bogotá D.C.
2023**

Abstract

Platelets are cells derived from the hematopoietic lineage and from its formation, through the megakaryocyte originating in the bone marrow and according to recent studies in the lung. This process allows platelets to perform functions such as: clots formation, secretion of platelet granules, and formation of eicosanoids and prostaglandins (Holinstat M., 2017 & Roman L., 2021). Therefore, it has been sought to determine the presence of platelets at different altitudes and whether it is affected by altitude, with the aim of understanding the physiology of the animal regarding its platelet formation.

The objective of this study is to know the platelet value of cats at the altitude of Bogotá city and thus determine if there is platelet variation. Additionally, to analyze whether differences are found in the concentration of platelets at the altitude of Bogota city in healthy feline patients at different centrifugation speeds by means of an experimental study, using samples of crossbred felines (n = 60) with optimal health status. Blood from each animal was collected in EDTA tubes and centrifuged at 1000, 2000 and 3000 revolutions for 10 minutes each. Following the centrifugation process, the results of the platelet concentration evaluated by manual counting presented statistically significant differences between them and several related articles. This study concludes that it is feasible to perform the manual platelet count at different centrifugation speeds, in order to obtain the results and determine whether the revolutions cause an impact on them.

Keywords: Platelets, altitude, Bogotá D.C, platelet concentration, revolutions, centrifugation, felines.

Resumen

Las plaquetas son células derivadas del linaje hematopoyético y a partir de su formación por medio del megacariocito se originan en la médula ósea y según estudios recientes en el pulmón. Este proceso permite que las plaquetas cumplan funciones como: formación de coágulos, secreción de gránulos plaquetarios y formación de eicosanoides y prostaglandinas. (Holinstat M., 2017 & Roman L., 2021). Por lo anterior, se ha buscado determinar la presencia de plaquetas en diferentes alturas y si este se ve alterado por la misma, entendiendo la fisiología del animal en cuanto a lo relacionado con su formación plaquetaria.

El objetivo de este estudio, es conocer el valor plaquetario de los felinos a la altura de la ciudad de Bogotá y así determinar si hay variación plaquetaria. Adicionalmente, analizar si se encuentran diferencias en la concentración de plaquetas a la altura de la ciudad de Bogotá en pacientes felinos sanos a diferentes velocidades de centrifugación por medio de un estudio experimental, utilizando muestras de felinos mestizos ($n = 60$) con estado de salud óptimo. La sangre de cada animal fue recolectada en tubos con EDTA y centrifugada a 1000, 2000 y 3000 revoluciones durante 10 minutos cada una. Después del proceso de centrifugación, los resultados de la concentración de plaquetas evaluados por conteo manual presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas y varios artículos relacionados. Se concluye de este estudio, que es factible realizar el conteo de plaquetas manual a diferentes velocidades de centrifugación, para así, obtener los resultados y conocer si las revoluciones causan impacto en ellos.

Palabras claves: Plaquetas, altura, Bogotá D.C, concentración plaquetaria, revoluciones, centrifugación, felinos.

Tabla de contenido

1. Planteamiento del Problema	7
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo General	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3. Justificación	9
4. Marco Teórico	11
4.1 Factores de crecimiento en el PRP	12
4.1.1 PDGF	12
4.1.2 TGF-BETA	13
4.1.3 FGF	13
4.1.4 IGF	13
4.1.5 VEGF	13
4.1.6 Tabla de factores de crecimiento	14
4.2 Obtención del PRP	14
4.2.1 Manejo del paciente:	15
4.2.2 Toma de muestra y extracción de sangre:	15
4.2.3 Separación Celular	16
4.3 Técnica de separación celular con centrifugación	16

4.3.1 Un solo centrifugado	16
4.3.2 Doble Centrifugación:	17
5. Marco metodológico	19
5.1 Unidad Experimental y Ambiente:	19
5.1.1 Factores de Inclusión:	19
5.1.2 Factores de Exclusión:	19
5.2 Delineamiento experimental:	20
5.3 Análisis Estadístico	21
6. Resultados	22
6.1 Tabla 1: Pacientes aptos e incluidos al estudio	22
6.2 Tabla 2: Resultados Centrifugación 1000 R	25
6.3 Tabla 3: Resultados Centrifugación 2000 R	26
6.4 Tabla 4: Resultados Centrifugación 3000 R	27
6.5 Gráficos:	28
6.5.1 Gráfico 1 Barras Centrifugación 1000 R	28
6.5.2 Gráfico 2 Barras Centrifugación 2000 R	28
6.5.3 Gráfico 3 Barras Centrifugación 3000 R	29
6.5.4 Gráfico 4 línea tendencia de las centrifugaciones	30
6.5.6 Gráfico 5 Porcentaje de resultados	31

6.5.7 Gráfico 6 Promedio de los resultados	32
7. Discusión	33
8. Conclusiones	35
9. Recomendaciones	36
10. Referencias bibliográficas	37

1. Planteamiento del Problema

Las variaciones altitudinales y latitudinales se han convertido en grandes fuentes para la presentación de variaciones hematológicas tanto en los animales como en los humanos, debido a que, aumenta o disminuyen factores como la concentración de oxígeno, radiaciones cósmicas o incluso hasta la humedad atmosférica (Dávila P. et al., 2019; Alvarado P., Patino J. & Palacios T., 2018).

Los animales domésticos cuando se encuentran en grandes alturas como en la ciudad de Bogotá (2.600m s. n. m.), se produce una adaptación del organismo a la hipoxia, ya que, por la altura disminuye la presión atmosférica total y por ende, se presenta disminución parcial del oxígeno disponible en el medio, exigiendo al organismo una serie de ajustes que se ven reflejados en un aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, además, una mayor actividad del sistema hematológico caracterizada por una elevación de la hemoglobina sanguínea y por ende un aumento en la cantidad de glóbulos rojos (Dávila P. et al., 2019; Bossa M. et. al., 2012).

Adicionalmente, el plasma rico en plaquetas se le conoce un uso poco común en el sector de la medicina veterinaria, ya que es una biotecnología utilizada en especial por la medicina humana y en el desarrollo dentro de los centros de medicina estética, los cuales, se enfocan como promotores de colágeno y potencial rejuvenecedor, también, en la reparación de tendones, ligamentos, músculos y cartílago (Martínez A. et al., 2018; Espinoza C., 2018). En la medicina veterinaria, su uso se ve resaltado en lesiones de tendones y ligamentos, lesiones de tejidos blandos, cojeras y hasta enfermedades articulares degenerativas (Espinoza C., 2018; Cuadros Y., Siabato J. & Roque A., 2021; Jaramillo X. et. al., 2022).

Sin embargo, de acuerdo a lo anterior, los cambios hematológicos en los animales pueden verse afectados con la altitud, ya que el organismo se trata de adaptar pero, las necesidades o requerimientos del organismo son mayores por la falta de oxígeno en la altura; la cantidad de plaquetas puede variar por altitud y velocidad de centrifugación por lo que, es importante realizar un adecuado análisis y registro de plaquetas presentes en estos caso.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar la concentración de plaquetas en pacientes felinos sanos a 3 velocidades diferentes de centrifugación teniendo en cuenta la altura de la ciudad de Bogotá, Colombia.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar la cantidad de plaquetas obtenidas a causa de la centrifugación en distintas revoluciones.
- Comparar los niveles plaquetarios de los felinos posterior a cada centrifugación.
- Analizar los resultados obtenidos por el recuento de plaquetas manual a diferentes velocidades de centrifugación en la ciudad de Bogotá D.C.

3. Justificación

El recuento de la concentración de plaquetas se ha registrado en documentos como el proyecto “*Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas felinas: estudio celular*” realizado por Silva R., Rezende C., Paes F. y Carmona J. en 2011, con datos que a la fecha no se encuentran actualizados respecto a la cantidad de plaquetas encontradas en estudios de felinos; de la misma manera, esto se asocia a que la concentración de plaquetas varía a la altura de Bogotá, en donde también debería alterarse la totalidad del plasma rico en plaquetas. (Silva R. et al., 2011).

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un hemocomponente con fines terapéuticos cada vez más utilizado en diversas patologías musculoesqueléticas, debido a su potencial para reparar tejidos con baja capacidad curativa (Martínez A. et al., 2018; Carrillo P. et al., 2013). Existen protocolos típicos que incluyen 1 o 2 pasos de centrifugación para separar la sangre completa en 3 capas: una capa superior de plasma, una capa intermedia de leucocitos y una capa inferior de glóbulos rojos (RBC), para recolectar un concentrado de plaquetas en plasma. (Wu K. et al., 2016) donde es necesario tener en cuenta sus valores a diario. Este a su vez, es el volumen de plasma autólogo, el cual contiene una concentración de plaquetas superior al nivel basal, obtenido tras una centrifugación (Irrazabal C., Bizama A. & Monroy J., 2018).

Desde 1980, se realizó la primera aplicación del PRP en la medicina humana con el tratamiento de úlceras cutáneas, que ha permitido ampliar su uso en Oftalmología, Otorrinolaringología, Cirugía Maxilofacial y Estética, para el tratamiento de: heridas quirúrgicas, patologías musculoesqueléticas, quemaduras, reparación de nervios periféricos, con resultados positivos o prometedores (Carrillo P. et al., 2013). También, en la medicina veterinaria se ha

utilizado en alteraciones articulares degenerativas, artrosis, problemas de tendones, trombocitopenia, trombocitopatías, y ha estimulado el aumento de inmunoglobulinas en enfermedades virales, aporta albúminas, entre otras. (Pérez A., 2009).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, se conoce que la efectividad del PRP como uso potencial terapéutico de una alta concentración de plaquetas se basa en la capacidad para suministrar y liberar cantidades suprafisiológicas de factores de crecimiento esenciales y citoquinas de sus gránulos alfa para proporcionar un estímulo regenerativo que aumenta la cicatrización y promueve la reparación en tejidos que tienen bajo potencial de cicatrización (Wu K. et al., 2016), por ello es interesante e importante realizar un recuento en la concentración de plaquetas en felinos sanos para presentar una revisión más actualizada, teniendo en cuenta, los datos analizados y recolectados del protocolo de separación de la sangre, reiterando que en la altura de la ciudad de Bogotá, no se conocen estudios de este tipo en felinos.

4. Marco Teórico

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un concentrado autólogo de plaquetas en un pequeño volumen, es una fuente rica de factores de crecimiento. Actualmente representa una biotecnología emergente en la ingeniería de tejidos y la terapia celular (Nguyen T., 2011).

Las plaquetas con sus factores de crecimiento (FC) son importantes en el proceso de reparación de las heridas, llegando al sitio de la herida en el menor tiempo posible comenzando un proceso de coagulación y regeneración tisular e influyendo en procesos de angiogénesis, procesos inflamatorios y respuesta inmune (Cuadros Y., Siabato J. & Roque A., 2021). Son componentes clave en la hemostasia, estimulan la construcción de nuevo tejido conectivo y revascularización. Pueden ser transfundidas a los pacientes con trombocitopenia grave o disfunción plaquetaria y también para evitar hemorragias o inducir hemostasia (Sashwati R., 2010).

El concentrado de plaquetas es un volumen de plasma autólogo, no tóxico, ni inmunorreactivo, que contiene una cuenta plaquetaria cinco veces mayor (1,000,000 plaq/ μ L en 5 mL), que la que se encuentra en la sangre normal ($> 150,000$ plaq/ μ L) (Moreno L. et. al, 2004). Por eso, durante los últimos años, este producto ha aparecido de forma repetida en publicaciones científicas y en medios de comunicación generales como un producto que por sus características induce la curación y regeneración de los tejidos (González J., 2006). Dichas plaquetas son viables durante 7 días y continuarán liberando factores de crecimiento en el tejido durante este tiempo (López S. et. al, 2019).

Los factores de crecimiento (FC) son mediadores biológicos naturales que regulan la proliferación, diferenciación y quimiotaxis celular, así como la síntesis de matriz extracelular

(Graves D., Kang Y. & Kose D., 1994). Estas propiedades, demostrables in vitro, han llevado a proponer que tales factores desempeñan un papel importante en la regeneración de tejidos blandos y duros (Lynch S. et. al., 1989). También, son esenciales en la migración, diferenciación y proliferación celular y se han descrito un gran número de estas (González J., 2006). Sin embargo, la función principal es contribuir a la homeostasis a través de 3 procesos: adhesión, activación y agregación y estos se desencadenan durante una lesión (Alves R. & Grimalt R., 2017).

4.1 Factores de crecimiento en el PRP

Bioquímicamente, el PRP se compone de suero, leucocitos, plaquetas y factores de crecimiento, pero aunque la presencia conjunta de todos estos elementos favorece la acción del PRP, los elementos fundamentales son los factores de crecimiento, que ejercen la función de regeneración, en líneas generales, son el factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), el factor de crecimiento de transformación-beta (TGF-beta), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Beca T. et. al., 2007). Los cuales son definidos e identificados por *Beca T, Hernández G, Morante S y Bascones A.* en el documento *Plasma rico en plaquetas* de la siguiente manera:

4.1.1 PDGF

- Promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos, por un mecanismo de quimiotaxis.
- Activador de macrófagos.
- Mitógeno de células mesenquimales.

- Facilita la formación de colágeno tipo I.

4.1.2 TGF-BETA

- Quimiotaxis.
- Proliferación y diferenciación de las células mesenquimales.
- Síntesis de colágeno por los osteoblastos.
- Pro-angiogénesis.
- Inhibe la formación de osteoclastos.
- Inhibe la proliferación de células epiteliales en presencia de otros factores.

4.1.3 FGF

- Proliferación y diferenciación de los osteoblastos.
- Inhiben los osteoclastos.
- Proliferación de fibroblastos e inducción de la secreción de fibronectina por estos.
- Pro-angiogénesis por acción quimiotáctica sobre células endoteliales.

4.1.4 IGF

- Proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de revestimiento.
- Síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno I por los osteoblastos.

4.1.5 VEGF

- Quimiotaxis y proliferación de células endoteliales.

- Hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos.
- Mitógeno, proapoptótico, quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos.

A nivel de acción frente a las distintas estirpes celulares, todos estos efectos podrían resumirse en la tabla (Beca T. et. al., 2007).

4.1.6 Tabla de factores de crecimiento

FACTORES DE CRECIMIENTO	Proliferación pre/osteoblastos	Proliferación fibroblastos	Quimiotaxis	Síntesis de matriz extracelular	Vascularización
PDGF	++	++	+	+	*
TGFB	+/-	+/-	+	++	*
EGF	-	++	+	*	-
IGF	++	+	++	++	-
VEGF	+		-	-	++

++ Gran Aumento; + Aumento; - Sin Efecto; * Efecto Indirecto (Anitua E., 2000).

4.2 Obtención del PRP

Es un proceso que utiliza el principio de la separación celular por centrifugación diferencial, en el cual se extrae sangre se separan las distintas fases y se obtienen aquellas de mayor interés según sea el caso (Marx R., 1999).

Dependiendo del sistema empleado, las concentraciones de plaquetas, leucocitos, eritrocitos y FC pueden variar, entre las que se encuentran el Preparado Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), el Plasma Rico en Plaquetas y Factores de Crecimiento (PRPGF), el Plasma Rico en Plaquetas (PRP), el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP), el Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos (LR-PRP) y el Plasma Rico en Plaquetas y Pobre en Leucocitos (LP-PRP) (Moreno R. et. al. 2015).

Los equipos utilizados consisten en micro centrifugadoras como son separador celular de densidad gradiente Electromedics 500 (Medtronic), Compact Advanced Platelet Sequestration System (CAPSS), Equipo PRGF para la centrifugación y preparación del plasma (GAC Medica-España), el sistema Curasan y el sistema PCCS (Beca T. et. al., 2007).

4.2.1 Manejo del paciente:

El paciente no debe estresarse durante este procedimiento. Sin embargo, si se requiere una manipulación constante, puede producir excitación o miedo. (Rodríguez J., 2002). Se puede reflejar en un aumento de la frecuencia cardíaca y de la frecuencia respiratoria, además, provocará un aumento de la hemoglobina en la sangre, aumento del número de glóbulos rojos y por ende resultados alterados. (Dávila P. et al., 2019).

4.2.2 Toma de muestra y extracción de sangre:

Se puede extraer sangre de la vena yugular, vena cefálica o vena safena (Morton D., et. al., 1993), con el animal en decúbito lateral se rasura el cuello o el miembro anterior derecho, se limpia la zona de forma aséptica, y se cánula con la aguja. (Fragio C., Daza M. & García E., 2009). Esta se almacena en tubo tapa lila el cual contiene EDTA (anticoagulante) y se agregan 2 ml de la muestra de sangre de todas las especies en el tubo. De 0.- 2 ml de muestra

es recomendado para cachorros, felinos y razas pequeñas de otras especies. Se debe agitar suavemente unas diez veces para mezclar la sangre con el anticoagulante y luego está listo para el proceso de centrifugación. (Morton D., et. al., 1993; Ministerio de Salud del Salvador, 2013; Beca T., et. al., 2007).

4.2.3 Separación Celular

La fase de centrifugación debe ser realizada por un profesional para permitir la obtención de la máxima concentración de las plaquetas por unidad de volumen, sin la ruptura de estas. Se centrifuga el plasma con un equipo digital que nos va a garantizar que los parámetros de tiempos y velocidad son los adecuados. La velocidad de rotación depende del protocolo de obtención y del volumen recogido. Cualquier alteración en la estandarización del centrifugado puede producir daños estructurales en las células sanguíneas (Beca T. et. al., 2007; Cerquera M. & Riveros J., 2009).

4.3 Técnica de separación celular con centrifugación

4.3.1 Un solo centrifugado

Se puede realizar a una velocidad de 280 g (1.400 rpm) durante 7 minutos (Anitua E., 1999), o bien a 160 g (1.200 rpm) durante 10 minutos, según otros autores (Sonnleitner D., Huemer P. & Sullivan D., 2000; Lozada J. et. al., 2001; & Efeoglu C., Akçay Y. & Ertürk S., 2004). Con esta primera centrifugación se consigue separar la sangre completa en una franja roja inferior de hematíes y otra amarillenta superior de plasma. Este plasma contiene una concentración relativamente baja de plaquetas (es lo que se denomina plasma bajo o pobre en plaquetas, PPP) (Beca T. et. al., 2007).

Entre una franja y la otra se encuentra la mayor concentración de plaquetas, y recibe el nombre de franja leucocitaria, y en la franja inferior roja se encuentran los componentes celulares sanguíneos. Se extrae el plasma amarillento (PPP) del tubo de sangre con una jeringuilla y posteriormente se introduce en un nuevo tubo, se coloca el tapón del tubo de ensayo y se realiza la segunda centrifugación (Beca T. et al., 2007).

4.3.2 Doble Centrifugación:

El objetivo de la segunda centrifugación es separar y concentrar todavía más las plaquetas obteniendo como producto final el plasma rico en plaquetas. Esta segunda centrifugación se hará a una velocidad de 400 g (2000 rpm) (Rivera Z., 2020; Beca T. et al., 2007 & Gonshor A., 2002). Con este último proceso los tubos presentan una franja superior de suero sobrenadante de color amarillo claro, que contiene fibrinógeno y una concentración muy baja de plaquetas, y una franja inferior generalmente de color rojizo formada por PRP muy concentrado (Beca T. et. al., 2007).

Posteriormente se pipetea el suero sobrenadante y se queda un remanente de PRP de 0,5 mm aproximadamente en cada tubo, dependiendo de la cantidad inicial recogida. La concentración normal de las plaquetas en el hematocrito es de 33-40% de plaquetas, pero tras el proceso de doble centrifugado se puede obtener una concentración de plaquetas de 330% aproximadamente (Rivera Z., 2020; Beca T. et al., 2007)

Estudios realizados anteriormente por la universidad San Sebastián, señalan que con la velocidad de 800 rpm por 15 minutos y en 1300 rpm por 10 minutos, se registró un aumento considerable en la cantidad de plaquetas en comparación a la medición basal en sangre entera, pero, al realizar la centrifugación a 1600 rpm por 10 minutos se evidencio una disminución a

comparación de los resultados obtenidos con la primera velocidad registrada (Irrazabal C., Bizama A. & Monroy J., 2018).

Desde los comienzos de la investigación con PRP se han publicado numerosos trabajos de investigación que arrojan óptimos resultados en la aplicación de este plasma, estudios que en general son realizados con diferentes velocidades y tiempos de centrifugación, ya sean a través de sistemas automatizados, o sistemas manuales por medio de tubo con centrifugación (González M. et al., 2012), pero hay pocos reportes realizados con centrifugación simple, esto se podría atribuir principalmente a que si bien existe un aumento en la concentración de las plaquetas, este aumento no sobrepasa la media descrita en las diferentes investigaciones. (Irrazabal C., Bizama A. & Monroy J., 2018).

Beca T., et al, (2007) postula que en promedio tras el proceso de doble centrifugado se puede obtener una concentración de plaquetas de aproximadamente un 330% sobre el nivel de plaquetas en sangre entera. (Rivera Z., 2020). Sin embargo, otros autores describen un método de centrifugación simple en donde se obtendría un aumento de un 670% de plaquetas a 4000 rpm (Jensen T., et. al., 2004).

5. Marco metodológico

El trabajo de investigación se realizará con las muestras tomadas en la Clínica Veterinaria Cat Medical Care en la ciudad de Bogotá, Colombia., con un grupo de 60 felinos que serán seleccionados para dicho estudio teniendo en cuenta los factores de inclusión y se realizará el conteo manual de las plaquetas por Reacvet S.A.S.

5.1 Unidad Experimental y Ambiente:

Se seleccionarán a 60 pacientes felinos que deberán cumplir las siguientes características:

5.1.1 Factores de Inclusión:

- Felino doméstico.
- Sin antecedentes de enfermedad.
- Sin lesiones cutáneas o alteraciones morfológicas.
- Constantes fisiológicas dentro de la normalidad.
- Raza mestiza.
- Rango de edad de 0 a 2 años.
- Cuadro hemático con normalidad.
- Felino dentro de los parámetros establecidos sano.

5.1.2 Factores de Exclusión:

- Otra especie.
- Antecedentes de enfermedad.
- Lesiones cutáneas o alteraciones morfológicas.

- Constantes fisiológicas anormales.
- Mayor a 2 años.
- Felino con enfermedad que altere el sistema respiratorio y cardíaco.
- Felino dentro de los parámetros establecidos enfermo.

5.2 Delineamiento experimental:

Este proyecto iniciará con la colocación de un catéter de 22G en la vena cefálica del animal.

- Luego con una jeringa de 3mL se le extraerán 2 mL de sangre dependiendo del paciente, edad y raza y se depositara en un tubo de muestra tapa morada en tubo de 3 ml que contiene 7,5 mg de anticoagulante EDTA.
- Seguido de esto, con la muestra de sangre de los 60 felinos del estudio se realiza nuevamente el conteo plaquetario, homogeneizando 10 veces con oxalato de amonio y se lleva inmediatamente al laboratorio.
- En el laboratorio, se realiza un protocolo de 1000 revoluciones por 10 minutos , 2000 revoluciones por 10 minutos y 3000 revoluciones por 10 minutos con una centrifugación.
- Una vez obtenido el plasma después de la centrifugación, se dividirá en tres partes iguales y de ésta se desechará las dos terceras partes superiores.
- Posteriormente, a la tercera parte se le añaden 30 microlitros de azul de metileno y se mezcla 5 veces con ayuda de una micropipeta. (Ramirez C., 2018).
- Luego de eso, se medirán 20 microlitro de la solución total y se carga en un solo lado de la cámara de Neubauer específicamente en el cuadrante B y se deja reposar en una placa petri por 5 minutos para la sedimentación de las plaquetas, garantizar que en la cámara no

entren contaminantes y se encuentre apta para el trabajo aséptico en el laboratorio(Ramirez C., 2018).

- Por último, esta muestra se observará con el microscopio en objetivo 40X y se contarán de manera aproximada los trombocitos presentes en varios campos de la muestra, con el fin, de conocer cuál es el número de plaquetas en felinos sanos a la altura de la ciudad de Bogotá, mediante el conteo manual.

5.3 Análisis Estadístico

- Se realizará una estadística descriptiva con un análisis de varianza (ANOVA de medidas repetidas) con el fin de observar el efecto de la altitud de la ciudad de Bogotá sobre las concentraciones de plaquetas en los felinos mediante el conteo manual.

6. Resultados

Los datos fueron registrados del 07 de julio al 18 de agosto del 2023 en Bogotá D.C. tras las muestras obtenidas en la clínica veterinaria Cat Medical Care y analizadas por el laboratorio clínico veterinario Reacvet S.A.S. de Bogotá. Se puede observar en la Tabla 1 los pacientes incluidos según, edad, raza, sexo, estado de salud y resultado del examen clínico, los cuales, se encontraban dentro de los parámetros para el estudio; posteriormente, en las Tablas 2, 3 y 4, se pueden observar los resultados obtenidos poscentrifugación y el respectivo análisis estadístico ANOVA con su adecuado gráfico.

6.1 Tabla 1:

Pacientes aptos e incluidos al estudio para obtener la concentración de plaquetas

#	Nombre del paciente	Edad	Raza	Sexo	Estado
1.	Baru	2 meses	Mestizo	Macho	Sano
2.	Kora	3 meses	Mestizo	Hembra	Sano
3.	Haku	3 meses	Mestizo	Macho	Sano
4.	Mishka	3 meses	Mestizo	Macho	Sano
5.	Hugo	3 meses	Mestizo	Macho	Sano
6.	Micifu	4 meses	Mestizo	Hembra	Sano
7.	Cuajada	4 meses	Mestizo	Hembra	Sano
8.	Cata	4 meses	Mestizo	Hembra	Sano
9.	Nio	4 meses	Mestizo	Macho	Sano
10.	Thiago	4 meses	Mestizo	Macho	Sano
11.	Mona	4 meses	Mestizo	Hembra	Sano
12.	Azulejo	4 meses	Mestizo	Macho	Sano

13.	Colibri	4 meses	Mestizo	Hembra	Sano
14.	Kity	4 meses	Mestizo	Hembra	Sano
15.	Pepino	4 meses	Mestizo	Macho	Sano
16.	Avena	4 meses	Mestizo	Hembra	Sano
17.	Mulan	4 meses	Mestizo	Macho	Sano
18.	Ghost	4 meses	Mestizo	Macho	Sano
19.	Emili	5 meses	Mestizo	Macho	Sano
20.	León	5 meses	Mestizo	Macho	Sano
21.	Horus	5 meses	Mestizo	Macho	Sano
22.	Gato	6 meses	Mestizo	Macho	Sano
23.	Crispeta	6 meses	Mestizo	Hembra	Sano
24.	Gasper	6 meses	Mestizo	Macho	Sano
25.	Copito	6 meses	Mestizo	Macho	Sano
26.	Picasso	6 meses	Mestizo	Macho	Sano
27.	Julieta	6 meses	Mestizo	Hembra	Sano
28.	Shelby	6 meses	Mestizo	Macho	Sano
29.	Dali	6 meses	Mestizo	Macho	Sano
30.	Ronroneo	6 meses	Mestizo	Macho	Sano
31.	Fluffy	6 meses	Mestizo	Macho	Sano
32.	Filucho	7 meses	Mestizo	Macho	Sano
33.	Atenea	7 meses	Mestizo	Hembra	Sano
34.	Frida	7 meses	Mestizo	Hembra	Sano
35.	Rio	7 meses	Mestizo	Macho	Sano
36.	Kikki	7 meses	Mestizo	Hembra	Sano
37.	Alaska	7 meses	Mestizo	Hembra	Sano

38.	Lupita	8 meses	Mestizo	Hembra	Sano
39.	Kira	8 meses	Mestizo	Hembra	Sano
40.	Matty	8 meses	Mestizo	Macho	Sano
41.	Mila	8 meses	Mestizo	Hembra	Sano
42.	Lulo	9 meses	Mestizo	Macho	Sano
43.	Calico	11 meses	Mestizo	Hembra	Sano
44.	Amarillo	1 año	Mestizo	Macho	Sano
45.	Renata	1 año	Mestizo	Hembra	Sano
46.	Avellana	1 año	Mestizo	Hembra	Sano
47.	Suchi	1,5 años	Mestizo	Macho	Sano
48.	Perseo	2 años	Mestizo	Macho	Sano
49.	Koki	2 años	Mestizo	Hembra	Sano
50.	Julia	2 años	Mestizo	Hembra	Sano
51.	Tomasa	2 años	Mestizo	Hembra	Sano
52.	Dalia	2 años	Mestizo	Hembra	Sano
53.	Bin	2 años	Mestizo	Macho	Sano
54.	Dante	2 años	Mestizo	Macho	Sano
55.	Kiral	2 años	Mestizo	Hembra	Sano
56.	Lucky	2 años	Mestizo	Hembra	Sano
57.	Pepa	2 años	Mestizo	Hembra	Sano
58.	Rocky	2 años	Mestizo	Macho	Sano
59.	Molly	2 años	Mestizo	Hembra	Sano
60.	Milan	2 años	Mestizo	Macho	Sano

Nota: Esta tabla muestra los pacientes los cuales fueron incluidos al trabajo, los cuales fueron examinados en la clínica Cat Medical Care por Médicos Veterinarios Profesionales que autorizaron su participación en el estudio y contaban con el previo consentimiento informado por los propietarios.

6.2 Tabla 2:

Resultados de la concentración de plaquetas después de la centrifugación a 1.000 x 10 min

Paciente	Resultados/Plaquetas	Valor de Referencia
Frida	163	300-900
Mishka	182	300-900
Atenea	195	300-900
Matty	213	300-900
Amarillo	300	300-900
Renata	316	300-900
Filucho	325	300-900
Picasso	330	300-900
Gato	491	300-900
Thiago	503	300-900
Lulo	560	300-900
Pepa	625	300-900
Bin	715	300-900
Copito	750	300-900
Calico	805	300-900
Kira	975	300-900
Dante	1.075	300-900
Nio	1.085	300-900
Kira	1.100	300-900
Gasper	1.300	300-900

Nota: Esta tabla indica la cantidad de plaquetas presente en cada paciente de acuerdo con el valor de referencia analizada por el laboratorio clínico veterinario Reacvet S.A.S., 2023.

6.3 Tabla 3:

Resultados de la concentración de plaquetas después de la centrifugación a 2.000 x 10 min

Paciente	Resultados/Plaquetas	Valor de Referencia
Tomasa	30	300-900
Kora	50	300-900
Julia	54	300-900
Haku	125	300-900
Lucky	145	300-900
Rocky	150	300-900
Mulan	160	300-900
Mila	200	300-900
Molly	210	300-900
Suchi	240	300-900
Rio	252	300-900
Avellana	289	300-900
Julieta	306	300-900
Kikki	315	300-900
Shelby	380	300-900
Dalia	426,3	300-900
Micifu	472	300-900
Dali	488	300-900
Milan	489	300-900
Alaska	520	300-900

Nota: Esta tabla indica la cantidad de plaquetas presente en cada paciente de acuerdo con el valor de referencia analizada por el laboratorio clínico veterinario Reacvet S.A.S., 2023.

6.4 Tabla 4:

Resultados de la concentración de plaquetas después de la centrifugación a 3.000 x 10 min

Paciente	Resultados/Plaquetas	Valor de Referencia
Cata	49	300-900
Lupita	52	300-900
Mona	58	300-900
Colibri	90	300-900
Cuajada	100	300-900
Avena	104	300-900
Kity	125	300-900
Emili	150	300-900
Pepino	163	300-900
Perseo	214	300-900
León	230	300-900
Azulejo	305	300-900
Ronroneo	370	300-900
Ghost	405	300-900
Hugo	450	300-900
Fluffy	454	300-900
Horus	458	300-900
Koki	469	300-900
Crispeta	485	300-900
Baru	834	300-900

Nota: Esta tabla indica la cantidad de plaquetas presente en cada paciente de acuerdo con el valor de referencia analizada por el laboratorio clínico veterinario Reacvet S.A.S., 2023.

6.5 Análisis estadístico:

Los datos fueron analizados por el software SPSS (IBM®). Se realizó un análisis de Normalidad por la prueba de Shapiro Wilk. La variable respuesta mostró distribución anormal, por lo tanto, se realizó transformación por logaritmo. Análisis de varianza (ANOVA) fue realizado a un nivel de significancia de 0,05.

6.5.1 Tabla 5:

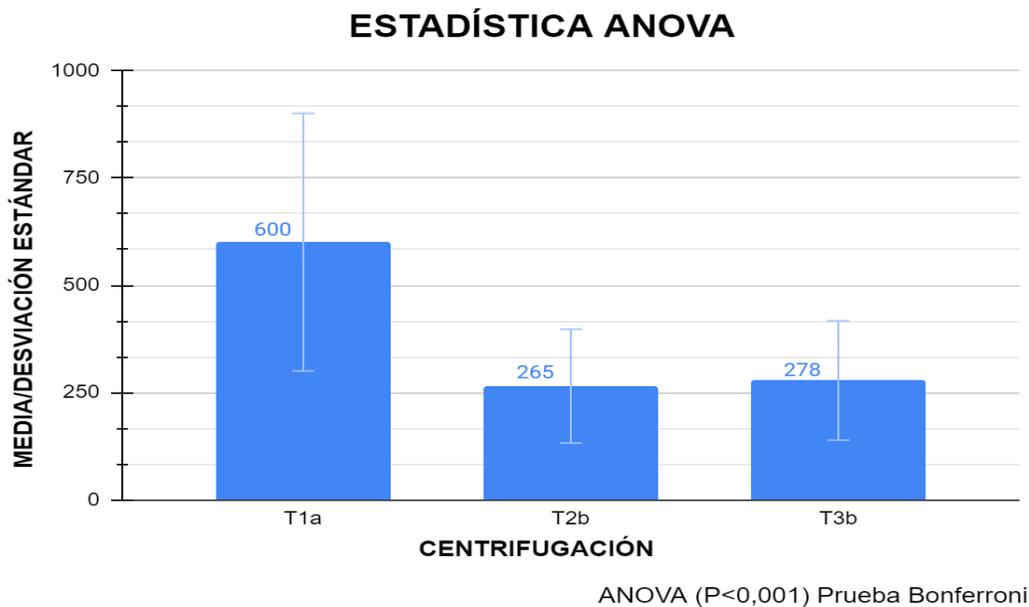
Media y su desviación con cada centrifugación

	1000R	2000R	3000R
Media	600,4	265,065	278,25
Desviación	358,4619777	156,2797097	207,1594542

Nota: Esta tabla indica la media y la desviación de los resultados obtenidos en cada centrifugación 1000R, 2000R y 3000R.

6.5.1 Gráfico 1:

Gráfico representativo de la desviación estándar entre resultados



Nota: Este gráfico representa la media y su desviación estándar de los resultados obtenidos en cada centrifugación, teniendo en cuenta la diferencia entre sí.

7. Discusión

En la actualidad existen diversos protocolos con procesos e instrucciones diferentes para la obtención de plasma rico en plaquetas en diferentes animales, la mayoría en caninos y humanos, principalmente en la extracción de sangre, la velocidad de centrifugación, en el uso de diferentes anticoagulantes y el resultado en la cantidad de plaquetas concentradas, sin embargo, los protocolos utilizados no se encuentran estandarizados, ni son similares, razón por la cual los métodos utilizados a la fecha, se determinan en criterio del investigador en base a las investigaciones existentes. (Aleixo G. et. al., 2011).

En el artículo *“Determinación de parámetros hematológicos normales en una población de caninos y felinos de una clínica veterinaria al norte de la ciudad de Bogotá”* realizado por Fuentes Moreno Carolina, reporta los resultados obtenidos de los cuadros hemáticos manuales de 10 felinos, cuyo promedio de la concentración de plaquetas fue de $340 \times 10^3/\text{ul}$. En comparación con los resultados obtenidos en la investigación del estudio, podemos resaltar que el promedio de la concentración de plaquetas con la velocidad de centrifugación a 1.000 revoluciones fue de $400 \times 10^3/\text{ul}$, el cual, es mayor a comparación, sin embargo, los promedios comparados se encuentran dentro de los valores de referencia elegidos para el estudio tomado del laboratorio REACVET S.A.S.

Varios autores describen el uso de diversos anticoagulantes como heparina, EDTA, citrato de sodio, ácido cítrico y soluciones de glucosa para recolectar sangre y obtener plasma rico en plaquetas. (Carmona J. et al., 2014; White J., 2000). Se eligió el anticoagulante EDTA porque, en comparación con otros anticoagulantes, inhibe el proceso de coagulación al eliminar el calcio de la sangre, reduce la activación plaquetaria al proteger las plaquetas durante el contacto de la

sangre con la superficie de vidrio dentro del tubo vacutainer y previene la contaminación. (Gómez B., Rodríguez L. & Díaz J. 2018; Carmona J. et al. 2014; White J., 2000).

Por otro lado, la cantidad de plaquetas colectadas en nuestro estudio es mayor en comparación con los métodos de doble centrifugación y conteo manual vs. automatizado en 10 felinos realizados por Fuentes C. (s.f.) en los que obtuvieron $340 \times 10^3/\text{ul}$ como promedio y como media $240 \times 10^3/\text{ul}$. No obstante, los métodos de doble centrifugación causan alteración en la morfología de las plaquetas y son más sensibles a errores en el proceso (Nagata M. et al., 2010; Fuentes C., s.f.). Además, se destaca que dentro del análisis estadístico Anova se encuentra una gran diferencia significativa entre los resultados de la centrifugación 1000 con los resultados de la centrifugación 2000 y 3000, pero entre los resultados con mayor revolución no hay diferencia significativa, teniendo en cuenta el nivel de significancia de 0,05.

Se puede considerar que los resultados obtenidos son netamente informativos teniendo en cuenta la concentración de plaquetas de cada paciente y su recuento manual, además indica una correlación con el conteo de las plaquetas a distintas velocidades de centrifugación a la altura de Bogotá y no directamente una respuesta clínica con la concentración de plaquetas (López C, Giraldo C & Carmona J., 2012). Además, el análisis del conteo de plaquetas manual a diferentes velocidades de centrifugación nos permite obtener resultados netamente informativos con base en cómo las revoluciones causan impacto en los resultados obtenidos y se encuentra una gran diferencia entre los mismos, también, el promedio, los porcentajes difieren entre sí consecuente al límite de referencia y según los resultados con cada centrifugación.

8. Conclusiones

Se evaluó que la mayoría de las muestras a la velocidad de centrifugación de 1000 revoluciones por 10 minutos a la altura de Bogotá D.C., tienen mayor certeza al rango de referencia optado en el estudio, puesto que en comparación con las otras velocidades de centrifugación hubo un mayor margen de error y diferencia significativa. Además, se encuentran escasos artículos que permitan establecer un protocolo apropiado con la velocidad de centrifugación más acertada para obtener un conteo manual de la concentración de plaquetas en el plasma.

La comparación entre los resultados de las plaquetas obtenidas después de realizar la centrifugación con las tres velocidades de centrifugación (1000 R, 2000 R, 3000 R), a la observación, se obtuvo diferencia significativa entre sí; la media y su desviación indicaron que a más revoluciones se encuentran menos concentración de plaquetas, las cuales, fueron, $600,4 \times 10^3/\text{ul}$, $265^3/\text{ul}$ y $371^3/\text{ul}$ respectivamente

El recuento de plaquetas mediante el uso de máquinas automatizadas es muy común en la actualidad debido a su simplicidad, el corto tiempo implementado en su uso y comodidad, sin embargo, el recuento manual de plaquetas suele tener mayor validez y seguridad, pero, es importante también, el manejo de las muestras para el recuento de plaquetas con un protocolo adecuado para el procesamiento previo de la muestra de sangre, ya que, puede influir en resultados erróneos factores como la manipulación por varios profesionales, el transporte, el ambiente y pueden afectar de manera indirecta generando un margen de error entre los resultados obtenidos.

9. Recomendaciones

- Aumentar la cantidad de pacientes para obtener una estructura del estudio con más resultados.
- Promover el recuento manual de plaquetas para comprobación de resultados en felinos.
- Normalizar la técnica de recuento de plaquetas manual para analizar el estado de salud de los pacientes.
- Desarrollar más estudios y actualizaciones de la concentración de plaquetas en pacientes felinos sanos.
- Crear un estudio comparativo entre el recuento manual de plaquetas y automatizado de distintas especies para identificar los resultados en la actualidad.

10. Referencias bibliográficas

- Aleixo G., Coelho M., Teixeira M., Mesquita E., Oliveira F., Zubieta L., Almeida T., Guimaraes A., Maia F., Zacarias T. (2011). Comparison between two protocols to obtain platelet-rich plasma in dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 63(3): 567-573. Doi: 10.1590/S0102-09352011000300005.
- Alvarado P., Patino J. & Palacios T. (2018) Perfil hematológico en perros afectado por el piso altitudinal, edad, sexo y raza del animal (Artículo de revisión). Recuperado de www.revistaecuadorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/100
- Alves R. & Grimalt R. (2017). A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disorders*;4:18-24. Recuperado de <https://karger.com/sad/article/4/1/18/291354>
- Anitua E. (1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implant*;14(4):529- 35. Recuperado de https://www.academia.edu/download/59758328/ANITUA_PLATELET20190616-68815-1waleup.pdf
- Anitua E. (2000). Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (P.R.G.F). Editorial: Puesta al día publicaciones; Vitoria-España. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/Un-nuevo-enfoque-en-la-regeneración-ósea%3A-plasma-en-Aldecoa-Andia/afa794ebd4caf65026e81e076a74823fadc9e520>
- Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. (2007). Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol*; 19, 1: 39-52. Recuperado de <https://scielo.isciii.es/pdf/peri/v19n1/original4.pdf>

- Bossa M., Valencia V., Carvajal B. & Ríos L. (2012). Automated hemogram values for healthy dogs aged 1 to 6 years attended at the Veterinary Hospital-Universidad de Antioquia (Colombia), 2002-2009. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 409-416. Recuperado de <https://editorial.uniamazonia.edu.co/index.php/fagropec/article/view/357>
- Carmona J., Ríos E., Vilar J., Giraldo C. & López C. (2014). Efectos de dos anticoagulantes sobre el conteo celular y parámetros de activación plaquetaria de plasma rico en plaquetas de bovinos. *Arch Med Vet*. 46(3): 375-380. Doi: 10.4067/S0301-732X2014000300005.
- Carrillo P., González A., Macías S. & Pineda C. (2013). Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa. *Cirugía y cirujanos*, 81(1), 74-82. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=39585>
- Cerquera M. & Riveros J. (2009). Determinación de parámetros hematológicos de 300 caninos sanos en 4 municipios de Cundinamarca y 10 localidades de Bogotá DC. Recuperado de https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/77/
- Cuadros Y., Siabato J. & Roque A. (2021). Uso de los factores de crecimiento presentes en el plasma rico en plaquetas como un tratamiento alternativo de lesiones músculo esqueléticas en animales. *Orinoquía*, 25(1), 47-64. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-37092021000100047&script=sci_arttext
- Dávila P., Márquez J. & Ordóñez T. (2019). Perfil hematológico en perros afectado por el piso altitudinal, edad, sexo y raza del animal (Artículo de revisión). *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 2(2), 151-166. Recuperado de <http://revistaecuatorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/100>

- Efeoglu C., Akçay Y. & Ertürk S. (2004). A modified method for preparing platelet rich plasma: An experimental study. *J Oral Maxillofacial Surg*;62:1403-7. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239104010377>
- Espinoza C. (2018). Estudio de caso de la aplicación de plasma rico en plaquetas (PRP), como tratamiento clínico y regenerativo en la enfermedad periodontal en un canino adulto. Recuperado de <https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/8879>
- Fragío C., Daza M. & García E. (2009). Transfusiones sanguíneas en perros y gatos. *Clínica veterinaria de pequeños animales*, 29(4), 0229-238. Recuperado de <https://ddd.uab.cat/pub/b/clivetpeqani/11307064v29n4/11307064v29n4p229.pdf>
- Gómez B., Rodríguez L. & Díaz J. (2018). Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Medicina interna de México*, 34(2), 244-263. Recuperado de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0186-48662018000200007&script=sci_abstract&tlng=pt
- Gonshor A. (2002). Técnicas para producir plasma rico en plaquetas y concentrado plaquetario: Antecedentes y proceso. *Revista Internacional de Odontología Restauradora y Conservadora*; 6 (6):583-93. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4548929>
- González J. (2006). Plasma rico en plaquetas. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 28(2), 89-99. Recuperado de https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-05582006000200001&script=sci_arttext
- González M., Arteaga M., Benito M. & Benito M. (2012). Aplicación del plasma rico en plaquetas (PRP) y sus derivados en implantología dental y cirugía plástica. *Investigación*

- Clínica*, 53(4), 408-418. Recuperado de <http://www.scielo.org.ve/pdf/ic/v53n4/art09.pdf>.
- Graves D., Kang Y. & Kose D. (1994). Growth factors in periodontal regeneration. *Compend Contin Educ Dent*; 18(15 Suppl): 672-7. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8039204/>
- Holinstat M. (2017). Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev.* 2017 Jun;36(2):195-198. doi: 10.1007/s10555-017-9677-x. PMID: 28667366; PMCID: PMC5709181. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-017-9677-x>
- Irarrazabal C., Bizama A. & Monroy J. (2018). Evaluación de la concentración de plaquetas a partir de distintas velocidades de centrifugación para obtención de plasma rico en plaquetas en caninos domésticos. *Medicina Veterinaria e Investigación*, 38. Recuperado de <https://resources.uss.cl/upload/sites/16/2017/12/revistaN2MedicinaVeterinaria.pdf#page=33>
- Jaramillo X., Fonseca J., Delgado K., Gómez F. & Mendoza J. (2022). Uso de plasma rico en plaquetas como coadyuvante en el tratamiento quirúrgico de la ruptura del tendón calcáneo común en gatos. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 25(1). Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262022000100019&script=sci_arttext
- Jensen T., Rahbek O., Overgaard S. & Soballe K. (2004). Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation - An experimental study in dogs. *J Orthop Res* 22, 653-658. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.orthres.2003.10.006>

- López C, Giraldo C & Carmona J. (2012). Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: estudio celular. *Arch Med Vet.* 44(2): 109-115. Doi: 10.4067/S0301-732X2012000200003.
- López S, Vilar J., Sopena J., Damià E., Chicharro D., Carrillo J., Cuervo B., Rubio A. (2019). Assessment of the Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Traumatic Canine Fractures. *International journal of molecular sciences*; 20(5): 1075. <https://doi.org/10.3390/ijms20051075>
- Lozada J., Caplanis N., Proussaefs P., Willardsen J., Kammeyer G. (2001). Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I-Background and processing techniques. *J Oral Implantol*; 27:38-42. Recuperado de <https://meridian.allenpress.com/joi/article-abstract/27/1/38/373>
- Lynch S., Williams R., Polson A., Howell T., Reddy M., Zappa U. & Antoniadis H. (1989). A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*; (16): 545-8. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-051X.1989.tb02334.x>
- Martínez A., Ruiz F. & Garcia J. (2018). *Platelet-rich plasma: Myth or reality?*. *Radiología* (English Edition), Vol. 60 (6), 465-475. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2173510718300764>
- Marx R. (1999). Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Tissue Engineering: Applicationns in Maxillofacial Surgery and Periodontics.*

Editorial: Quintessence Books. Illinois -Estados Unidos. Recuperado de <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573105975048134656>

Ministerio de Salud del Salvador. (2013). Manual de toma, manejo y envío de muestras de laboratorio. Recuperado de <https://fundacion-rama.com/wp-content/uploads/2022/06/3216.-Manual-de-toma-manejo-y-...-Ministerio.pdf>

Moreno C. S.f. Determinación de parámetros hematológicos normales en una población de caninos y felinos de una clínica veterinaria al norte de la ciudad de Bogotá. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/55998/DETPARHEM.pdf?sequence=1>

Moreno R., Gaspar M., Jiménez J., Herreros J., Villimar A. & López P. (2015). Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora. *Farmacia hospitalaria*, 39(3), 130-136.

Moreno L., Marín G., Enríquez F., González J., Moreno L., Cisneros L. & De la Sancha Mondragón L. (2004). Utilización de plasma rico en plaquetas para regeneración periodontal en un perro. *Revista odontológica mexicana*, 8(3). Recuperado de https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-63432015000300002&script=sci_arttext&tlng=en

Morton D., Abbot D., Barclay R., Close B., Ewbank R., Gask D. & Jennings M. (1993). *Extracción de sangre en los mamíferos y aves de laboratorio. Primer informe del grupo conjunto de trabajo BVA. FRAME/RSPCA/UFAW sobre El Refinamiento*. Recuperado de [https://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-extracci%25C3%25B3n-sa ngre.pdf](https://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-extracci%25C3%25B3n-sa%20ngre.pdf)

- Nagata M., Messoria M., Furlaneto F., Fucini S., Bosco A., Garcia V., Deliberador T., de Melo L. (2010). Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent.* 4(4): 395-402. Recuperado de <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0039-1697859>
- Nguyen T. (2011). Applications of Platelet-Rich Plasma in Musculoskeletal and Sports Medicine: An Evidence-Based Approach; *PMR* 2011; 3:226-250. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934148210013390>
- Pérez A. (2009). Aplicaciones del plasma en pequeños animales. *Medicina y cirugía de perros y gatos*. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/4076/407652405003.pdf>
- Ramirez C. (2018). Utilidad del azul de metileno para el recuento de plaquetas en la cámara de Neubauer. Recuperado de <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10541>
- Rivera Z. (2020). Factores de crecimiento en el plasma: herramienta terapéutica en dermatología. *Rev Digit Postgrado.* Vol. 9(3).e231. doi: 10.37910/RDP.2020.9.3.e231.
- Rodríguez J. (2002). Agregación plaquetaria en perros con cáncer. *Vector Plus*. Recuperado de https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/7391/1/0231633_00020_0005.pdf
- Román L. (2021). *Hematología veterinaria: mecanismos productores de trombocitopenia en caninos* (Doctoral dissertation). Recuperado de <http://rid.unrn.edu.ar/handle/20.500.12049/8195>
- Sashwati R. (2010). Platelet Rich Fibrin Matrix Improves Wound Angiogenesis via Inducing Endothelial Cell Proliferation; *Wound Repair Regen* 2011; 19(6): 753–766. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-475x.2011.00740.x>

- Silva R., Rezende C., Paes F. & Carmona J. (2011). Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas felinas: estudio celular. *Archivos de medicina veterinaria*, 43(2), 187-190. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2011000200013>
- Sonnleitner D., Huemer P. & Sullivan D. (2000). A simplified technique for producing platelet rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: A clinical note. *Int J Oral Maxillofac Implant*;15(6):879-82. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11151589/>
- White J. (2000). EDTA-induced changes in platelet structure and function: clot retraction. *Platelets*. 11(1): 49-55. Recuperado de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09537100075805>
- Wu K., Peter I., Diaz R., & Borg J. (2016). Platelet-rich plasma. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*, 27(4), 825-853. Recuperado de [https://www.pmr.theclinics.com/article/S1047-9651\(16\)30043-2/abstract](https://www.pmr.theclinics.com/article/S1047-9651(16)30043-2/abstract)