

Efectos de dos anticoagulantes sobre el conteo celular y parámetros de activación plaquetaria de plasma rico en plaquetas de bovinos

Effect of two anticoagulants on the cell count and platelet activation parameters from bovine platelet rich plasma

JU Carmona^{a*}, E Ríos^b, JM Vilar^b, CE Giraldo^a, C López^a

^aGrupo de Investigación Terapia Regenerativa, Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.

^bDepartamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, Las Palmas de Gran Canaria, España.

SUMMARY

The aim of this study was to compare plasma rico en plaquetas (PRP) obtained from blood of cows using sodium citrate (SC) or citrate, citric acid, dextrose-solution A (ACD-A) anticoagulants regarding the content of platelets and leukocytes (WBC), and the degree of platelet activation in whole blood (WB) and (PRP). Blood samples were collected from 15 clinically healthy Holstein cows in tubes with SC and ACD-A. Samples were processed by a double centrifugation tube method for producing PRP. PRP and WB were analysed for hemogram and automated determination of mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width volume (PDW). Platelet counts differed ($P < 0.0001$) between WB and PRP for each separate anticoagulant. The concentration of platelets in PRP was 2,3 and 2,5 times for SC and ACD-A, respectively, compared to platelet counts in WB for both anticoagulants. PRP platelet concentration did not differ between both anticoagulants. Values for MPV and PDW were similar in PRP obtained after centrifugations regardless of the anticoagulant used. Leukocyte counts were higher ($P < 0.001$), particularly lymphocytes, in PRP obtained with SC in comparison with ACD-A. In conclusion, results obtained allowed to establish that there are no differences for obtaining bovine PRP, using either SC or ACD-A as anticoagulants. The results suggest platelet conservation homogeneous and structurally stable in bovine PRP, especially when sodium citrate was used.

Key words: cow, platelet concentrates, regenerative medicine, sodium citrate, ACD-A.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar el plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido de sangre de vacas empleando citrato de sodio (CS) o citrato, ácido cítrico, dextrosa-solución A (ACD-A) como anticoagulantes con relación al contenido de plaquetas y leucocitos y el grado de activación de las plaquetas en la sangre entera (SE) y plasma rico en plaquetas (PRP). Se recolectaron muestras de SE de 15 vacas Holstein clínicamente sanas en tubos con CS y ACD-A. Las muestras fueron procesadas por un método de centrifugación doble en tubo para obtener PRP. El PRP y la SE fueron analizados para hemograma y determinación automatizada del volumen plaquetario medio (VPM) y la amplitud de distribución de las plaquetas (ADP). Los recuentos de plaquetas difirieron ($P < 0,0001$) entre SE y PRP para cada anticoagulante por separado. La concentración de plaquetas en el PRP fue 2,3 y 2,5 veces para CS y ACD-A, respectivamente, en comparación con los conteos de plaquetas en SE para ambos anticoagulantes. La concentración de plaquetas en PRP no difirió entre ambos anticoagulantes. Los valores del VPM y ADP fueron similares en los plasmas obtenidos posterior a las centrifugaciones independientemente del anticoagulante utilizado. Los conteos de leucocitos fueron mayores ($P < 0,001$), particularmente de linfocitos, en el PRP con CS en comparación con el PRP obtenido con ACD-A. En conclusión, los resultados obtenidos permitieron establecer que no existen diferencias para la obtención de PRP bovino, mediante el uso de CS o ACD-A como anticoagulantes. Los resultados sugieren la conservación de plaquetas homogéneas y estables estructuralmente en el PRP bovino, especialmente cuando se utilizó citrato de sodio.

Palabras clave: vaca, plasma rico en plaquetas, medicina regenerativa, citrato de sodio, ACD-A.

INTRODUCCIÓN

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un concentrado de plaquetas y leucocitos suspendidos en plasma (Dohan y col 2012, McCarrel y col 2012, Carmona y col 2013). Cuando el PRP es puesto en contacto con sustancias activadoras como sales de calcio o trombina, pierde su forma líquida y se transforma en un biomaterial conocido como gel rico

en plaquetas (GRP) (Dohan Ehrenfest y col 2012, Carmona y col 2013). El GRP libera de manera gradual diversos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante beta isoforma 1 (TGF- β_1) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Giraldo y col 2013) y otras proteínas que disminuyen la inflamación y aceleran la reparación de tejidos traumatizados o afectados por enfermedades crónicas (Carmona y col 2011). Debido a estas propiedades biológicas, el GRP ha sido empleado en medicina humana como coadyuvante quirúrgico en cirugía alveolomaxilar (Rodrigues y col 2012), plástica

Accepted: 26.12.2014.

* Calle 65 N° 26-10, Manizales, Colombia; carmona@ucaldas.edu.co

(Sommeling y col 2013) y ortopédica (Mehta y col 2012). También ha sido empleado como tratamiento de lesiones tendinosas (Baksh y col 2013), úlceras cutáneas crónicas (Martínez-Zapata y col 2012) y úlceras corneales (López-Plandolit y col 2010), entre otras aplicaciones clínicas.

En medicina veterinaria se ha reportado la utilización de PRP en caballos (Carmona y col 2011, Carmona y col 2013) y perros (Silva y col 2012) en el tratamiento de afecciones locomotoras agudas y crónicas. Por otra parte, se ha descrito un método para producir PRP en bovinos con finalidades terapéuticas (López y col 2012). Existen diversos métodos y protocolos para producir PRP a partir de sangre entera de seres humanos o animales (Carmona y col 2008, Silva y col 2011^{a,b}, Dohan Ehrenfest y col 2012, Carmona 2013). Estos métodos pueden ser automatizados, semiautomatizados y manuales. A pesar de que existe información sobre las características celulares y moleculares (concentración de factores de crecimiento) de PRP en seres humanos y animales obtenidos con un método y un anticoagulante en particular, existen pocos estudios comparativos del empleo de diferentes anticoagulantes sobre el recuento celular y el grado de activación de las plaquetas (Lei y col 2009). La viabilidad y los cambios estructurales de las plaquetas equinas fueron investigados mediante la evaluación de los parámetros, volumen plaquetario medio (VPM) y ancho de distribución de las plaquetas (ADP) (Vasconcelos y col 2003), que se correlacionan con el grado de activación de las plaquetas y con la presencia de formas inmaduras y grandes en la circulación, respectivamente.

El objetivo fundamental de la presente investigación fue comparar el PRP obtenido de sangre de vacas empleando citrato de sodio (CS) o citrato, ácido cítrico, dextrosa-solución A (ACD-A) como anticoagulante con relación al contenido de plaquetas y leucocitos. La hipótesis de este estudio fue que los PRP obtenidos con CS y ACD-A son similares en cuanto a sus recuentos de plaquetas y de leucocitos, así como en el volumen plaquetario medio (VPM) y ancho de distribución de las plaquetas (ADP).

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por un comité local de ética para experimentación con animales y realizado durante julio-agosto de 2011.

ANIMALES

Se utilizaron quince (15) vacas de raza Holstein con una edad mediana de 5 años (rango: 2,5-10 años), en ciclo de lactancia, de un hato localizado a 2.280 msnm en la región andina colombiana (latitud 5°1'44.28"N, longitud 75°26'2.47"O). Las vacas fueron clínicamente sanas al momento de la recolección de la sangre. Estas fueron evaluadas mediante examen físico, hemograma,

pruebas de química clínica, examen coprológico y frotis de sangre periférica para descartar la presencia de Babesia y Anaplasma. Las vacas pertenecían a una misma granja, por lo que las condiciones de alimentación y manejo de los animales fueron similares.

RECOLECCIÓN DE LA SANGRE

De cada vaca se colectó sangre mediante un catéter endovenoso 14G de 6 cm (NIPRO14GX2", Nipro, San Pablo, Brasil) que fue fijado con suturas en una de las venas yugulares. Los catéteres fueron cerrados con un tapón libre de látex (IN-Stopper, B Braun, Melsungen, Alemania) y lavados con 5 mL de suero heparinizado. La sangre fue obtenida mediante el acople de un catéter mariposa 21 G (Blood Collection Set, BD Vacutainer, New Jersey, USA) al tapón (López y col 2012). La sangre de cada vaca fue depositada en tubos de 4,5 mL con CS al 3,2% w/v (BD Vacutainer, New Jersey, USA) y en tubos de 8,5 mL con 1,5 mL de ACD-A (ácido cítrico 8g/L, citrato de sodio 22 g/L y dextrosa 24,5 g/L, con relación sangre final: ACD-A 10:2) (BD Systems, Vacutainer®, Reino Unido). El primer tubo recolectado con cada anticoagulante fue descartado, para evitar el efecto de dilución o bioquímico del suero heparinizado. Los tubos con sangre fueron refrigerados en una nevera y transportados al laboratorio, donde fueron procesadas las muestras de sangre dentro de 1 hora de haber sido obtenidas.

MÉTODO DE CENTRIFUGADO SIMPLE EN TUBO

Los tubos con sangre con ambos anticoagulantes fueron centrifugados (Hettich Rotofix 32, Tuttlingen, Alemania) a 720 g por 5 minutos. La centrifugación permitió separar la sangre en tres fases: volumen globular aglomerado (VGA), capa leucocitaria y plasma. El plasma fue arbitrariamente dividido en dos fracciones, fracción plasmática A (FPA) y fracción plasmática B (FPB). La FPA correspondió al 50% del plasma más cercano a la capa leucocitaria y la FPB al 50% del plasma inmediatamente superior a la FPA (figura 1A). La FPA fue recolectada con la aguja de un catéter endovenoso 14G de 6 cm (NIPRO14GX2", Nipro, San Pablo, Brasil), acoplado a una jeringa de plástico de 20 mL. En total se obtuvieron de cada vaca 21 mL de FPA con cada anticoagulante. Una alícuota de 1 mL de esta fracción fue empleada para los análisis hematológicos.

MÉTODO DE CENTRIFUGADO DOBLE EN TUBO

La FPA (20 mL) fue depositada en dos tubos estériles de plástico sin aditivo (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), los que fueron centrifugados a 720 g por 5 minutos. El PRP fue obtenido posterior a eliminar 7,5 mL de la fracción plasmática superior (75%) de cada tubo (figura 1B). El PRP fue homogenizado suavemente y utilizado en el estudio.

Cuadro 1. Valores (promedio \pm desviación estándar) del conteo de plaquetas, volumen plaquetario medio (VPM) y ancho de distribución de las plaquetas (ADP) para sangre entera, fracción plasmática A y plasma rico en plaquetas de sangre obtenida con citrato de sodio y ACD-A.

Values (mean \pm standard deviation) of platelet count, mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDW) for whole blood, plasma fraction-A and platelet-rich plasma from blood obtained with sodium citrate and ACD-A.

| Variable | Sangre entera | | Fracción plasmática A | | Plasma rico en plaquetas | |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | Citrato de sodio | ACD-A | Citrato de sodio | ACD-A | Citrato de sodio | ACD-A |
| Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 365 \pm 56,7 ^a | 355 \pm 71,8 ^a | 286,7 \pm 80,0 ^a | 300 \pm 49,1 ^a | 851 \pm 217,8 ^b | 898,6 \pm 176,7 ^b |
| VPM fL | 3,07 \pm 0,29 | 3,4 \pm 0,46 | 3,05 \pm 0,35 | 3,11 \pm 0,40 | 3,2 \pm 0,27 | 3,27 \pm 0,35 |
| ADP % | 16,5 \pm 0,5 ^a | 16,9 \pm 0,90 ^a | 18,1 \pm 0,87 ^b | 17,7 \pm 0,83 ^b | 16,7 \pm 0,46 ^a | 16,9 \pm 0,83 ^a |

Letras distintas en la misma fila señalan diferencias significativas, $P < 0,001$.
Different letters in a same raw means $P < 0,001$.

ANÁLISIS HEMATOLÓGICO

Se realizó un análisis hematológico por triplicado de la sangre obtenida con ambos anticoagulantes así como en la FPA y PRP. Para ello se empleó un analizador hematológico de impedancia volumétrica (Celltac- α MEK 6450, Nihon Kodhen, Japón), validado para sangre bovina, determinando el recuento de plaquetas (PLT/ μL), volumen plaquetario medio (VPM), ancho de distribución de las plaquetas (ADP), recuento de leucocitos total y diferencial y volumen globular aglomerado (VGA). El valor promedio de las tres repeticiones de cada compuesto hematológico fue usado en el análisis estadístico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron presentados en función de la prueba de normalidad (prueba de Shaphiro-Wilk (S-W)). Las variables que exhibieron normalidad (S-W: $P > 0,05$) son presentadas como promedio y desviación estándar (DE). Las variables que presentaron distribución no paramétrica (S-W: $P < 0,05$) son presentadas como mediana y rango intercuartil (RI). Las variables paramétricas fueron evaluadas con un ANOVA de una vía seguida por una prueba *post-hoc* de Games-Howell (prueba de Levene: $P < 0,05$). Las variables no paramétricas fueron analizadas mediante una prueba de Kruskal-Wallis y como prueba *post-hoc* se emplearon comparaciones pareadas de U de Mann-Whitney. Los valores de las variables fueron correlacionados de manera general entre todas las variables hematológicas (sangre entera, FPA y PRP) y específicamente dentro de cada uno de ellos, mediante una prueba de Spearman (ρ) y para ambos anticoagulantes. Un valor de $P < 0,05$ fue aceptado como significativo para todas las pruebas.

RESULTADOS

Los recuentos de plaquetas fueron similares ($P > 0,05$) entre la sangre entera y la FPA, independiente del anticoagulante usado. De igual manera no se observaron

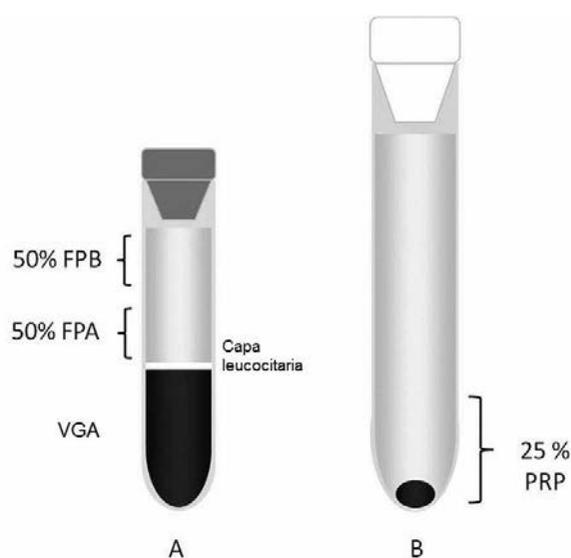


Figura 1. A: Tubo con sangre posterior a una centrifugación a 720 g \times 5 minutos, se aprecia el volumen globular aglomerado (VGA) y las fracciones plasmáticas A y B (FPA y FPB). B: Tubo con fracción plasmática A (FPA) posterior a una centrifugación a 720 g \times 5 minutos, se aprecia el plasma rico en plaquetas (PRP) sobre una pequeña masa de eritrocitos.

A: Blood tube after centrifugation at 720 g \times 5 minutes, shows the packed cellular volume (PCV) and plasma fraction -A and -B (PFA and PFB). B: Tube with plasma fraction A (PFA) after centrifugation at 720 g \times 5 minutes, shows the platelet rich plasma (PRP) over a small mass of erythrocytes.

diferencias ($P > 0,05$) en el número de plaquetas entre los PRP producidos con ambos anticoagulantes. Sin embargo, la cantidad final de plaquetas en el PRP fue mayor ($P < 0,0001$) en comparación con la sangre entera y la FPA para ambos anticoagulantes. En PRP las plaquetas fueron 2,3 y 2,5 veces el número de plaquetas de la sangre original obtenida con citrato de sodio y ACD-A, respectivamente. El VPM en la FPA y en el PRP se mantuvo similar al de la sangre de la que fueron obtenidos, independiente del anticoagulante utilizado ($P > 0,05$). Sin embargo, el ADP aumentó ($P < 0,001$) en la FPA con ambos anticoagulantes,

Cuadro 2. Valores (promedio ± desviación estándar) del conteo leucocitario absoluto y volumen globular aglomerado de los diferentes compuestos hematológicos para cada anticoagulante.

Values (mean ± standard deviation) for leukocyte absolute count and cell packed volume of the different hematologic compound for each anticoagulant.

| Variable | Sangre entera | | Fracción plasmática A | | Plasma rico en plaquetas | |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| | Citrato de sodio | ACD-A | Citrato de sodio | ACD-A | Citrato de sodio | ACD-A |
| Leucocitos x 10 ³ /μL | 8,5 ± 0,24 | 7,7 ± 0,23 | 2,63 ± 0,4 ^a | 1,8 ± 0,21 ^a | 11,2 ± 0,64 ^{a,b} | 6,4 ± 0,53 |
| Linfocitos x 10 ³ /μL | 5,0 ± 0,18 | 4,5 ± 0,17 | 2,2 ± 0,17 | 1,6 ± 0,17 | 8,9 ± 0,46 ^c | 5,4 ± 0,5 |
| Monocitos x 10 ³ /μL* | 0,0 (0,1) | 0,1 (0,1) | 0,0 (0,0) | 0,0 (0,1) | 0,2 (0,5) ^d | 0,15 (0,2) ^d |
| Granulocitos x 10 ³ /μL* | 2,4 (1,6) ^e | 2,1 (1,3) ^e | 0,3 (0, 4) | 0,2 (0,9) | 1,9 (1,8) | 0,8 (1,6) |
| Volumen globular aglomerado % | 28,0 ± 1,7 ^f | 26,4 ± 1,9 ^f | 0,36 ± 0,2 ^g | 0,37 ± 0,2 ^g | 1,4 ± 0,57 | 1,13 ± 0,5 |

* Valores son presentados como mediana (rango intercuartílico). a= valor significativamente diferente (VSD) entre sangre entera (SE) y fracción plasmática A (FPA) para ambos anticoagulantes (P < 0,001). b= VSD entre SE y FPA para ambos anticoagulantes, y plasma rico en plaquetas (PRP) de ACD-A (P < 0,001). c= VSD con SE ACD-A (P < 0,016), FPA CS (P < 0,001), y FPA ACD-A (P<0,016). d= VSD con SE y FPA para ambos anticoagulantes (P < 0,001). e= VSD con PFA para ambos anticoagulantes, y PRP ACD-A (P < 0,001). f= VSD con PFA y PRP para ambos anticoagulantes (P < 0,001). g= VSD con SE y PRP para ambos anticoagulantes (P < 0,001).

* Data are presented as median (interquartile range). a= significantly different value (SDV) between whole blood (WB) and plasma fraction A (PFA) for both anticoagulants (P < 0.001). b= SDV between WB and PFA for both anticoagulants, and ACD-A PRP (P<0.001). c= SDV with ACD-A WB (P<0,016), SC PFA (P < 0.001), and ACD-A PFA (P < 0.016). d= SDV with WB and PFA for both anticoagulants (P < 0.001). e= SDV with PFA for both anticoagulants, and ACD-A PRP (P < 0.001). f= SDV with PFA and PRP for both anticoagulants (P < 0.001). g= SDV with WB and PRP for both anticoagulants (P < 0.001).

en comparación con la sangre entera y el PRP correspondientes (cuadro 1).

Los recuentos de leucocitos totales fueron similares (P > 0,05) para la sangre obtenida con ambos anticoagulantes, y el PRP preparado con ACD-A (cuadro 2). Se observó una disminución (P < 0,05) de los leucocitos en las FPA obtenidas con ambos anticoagulantes, con una reducción en la cantidad de linfocitos y neutrófilos (P < 0,001); sin embargo, el número de leucocitos en el PRP fue mayor (P < 0,05) que en la sangre entera al utilizar citrato de sodio, con incremento (P < 0,001) especialmente de los linfocitos (cuadro 2). Las concentraciones de monocitos fueron mayores (P < 0,001) en ambos PRP en comparación con los demás componentes hematológicos. Los granulocitos fueron estadísticamente (P < 0,001) superiores en sangre entera para ambos anticoagulantes en comparación con los demás componentes sanguíneos (cuadro 2).

El primer proceso de centrifugación de la sangre original obtenida con citrato de sodio y ACD-A permitió reducir el volumen globular aglomerado (VGA) desde el 28% y 26%, respectivamente, a solo 0,4% (P < 0,001) en las FPA obtenidas con ambos anticoagulantes. Finalmente, el volumen de eritrocitos en los PRP de la sangre obtenida con citrato de sodio y ACD-A fueron solo 1,4 y 1,1% (P < 0,001), respectivamente.

DISCUSIÓN

La concentración final de células y factores de crecimiento en un PRP en particular dependen, de manera general, de factores intrínsecos y extrínsecos (Giraldo y col 2013). Los factores intrínsecos considerados para los bovinos enrolados en este estudio fueron la especie,

sexo, raza, edad (Giraldo y col 2013), estatus reproductivo, situación de salud, y el tratamiento concomitante con medicamentos (particularmente, antiinflamatorios y antiagregantes plaquetarios). Entre los factores extrínsecos que pueden influir sobre las características celulares y proteicas de un PRP se destaca el tipo de anticoagulante usado (Carmona y col 2011). En el mercado mundial se ofertan tubos con anticoagulantes como CS o ACD-A solo para uso diagnóstico y no para fines terapéuticos (Mazzucco y col 2009, Carmona y col 2011, Dohan Ehrenfest y col 2012, Carmona y col 2013). Sin embargo, por la experiencia de los autores y por los reportes en múltiples artículos científicos se puede decir que estos tubos reúnen las características necesarias para ser empleados en procedimientos terapéuticos (Rodríguez y col 2012, Carmona y col 2013). Según el conocimiento de los autores, solo están disponibles tubos de vacío con CS con capacidad para 4,5 mL de sangre o con ACD-A con capacidad para 6,4 mL de sangre. La posibilidad de utilizar tubos con mayor capacidad volumétrica es de suma trascendencia para el uso de PRP en medicina veterinaria, porque el empleo de menor número de tubos influye directamente sobre la bioseguridad, el tiempo y los costos de preparación del PRP (Carmona y col 2013).

Los resultados de este experimento permitieron comprobar que los PRP producidos de sangre entera bovina obtenida con citrato de sodio o ACD-A son similares en cuanto a sus recuentos de plaquetas y no se evidenciaron diferencias en los parámetros asociados de activación plaquetaria. Nosotros registramos un VPM bajo, particularmente cuando se utilizó citrato de sodio, que sugiere una mejor conservación de las plaquetas en reposo (Vasconcelos y col 2003). Sin embargo, como se ha observado previamente

(López y col 2012), los PRP con ambos anticoagulantes presentaron ADP bajas y comparables ($P > 0,05$) con las registradas en la sangre entera; mientras que las FPA presentaron ADP significativamente mayores ($P < 0,001$) en comparación con los valores observados en sangre entera y PRP. Se ha reportado que una ADP baja denota la presencia de una población de plaquetas homogénea y estable estructuralmente en el compuesto hematológico analizado (Vasconcelos y col 2003). Así, estos hallazgos sirven para corroborar la hipótesis que al menos en bovinos la ADP funciona mejor como indicador temprano de activación plaquetaria que el VPM (López y col 2012). Por otra parte, corrobora el hecho que las plaquetas bovinas sufren un proceso de activación reversible durante el primer centrifugado (ocasionado por la fricción con eritrocitos), el que desaparece cuando las plaquetas son nuevamente centrifugadas sin eritrocitos (Argüelles y col 2006).

Existe mucha controversia sobre el papel de los leucocitos en el PRP (Bielecki y col 2012). Sin embargo, en este estudio el PRP obtenido con ambos anticoagulantes presentó una concentración relativamente baja de leucocitos en comparación con el PRP de sangre procesada con métodos semiautomatizados (Carmona y col 2013). Este hallazgo podría ser deseable, pues se sabe que una concentración muy elevada de leucocitos, particularmente de granulocitos, puede desencadenar efectos catabólicos en explantes de tendones de caballo (McCarrel y col 2012). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito esto en bovinos.

En esta investigación se comprobó que el PRP elaborado con citrato de sodio concentró una cantidad significativamente mayor de leucocitos ($P < 0,001$), particularmente linfocitos en comparación con el PRP obtenido con ACD-A. A pesar que la concentración de leucocitos fue el doble en el PRP obtenido con CS en comparación con el PRP obtenido con ACD-A, técnicamente, ambos concentrados de plaquetas pueden ser clasificados como PRP-puro (P-PRP) (Dohan Ehrenfest y col 2012, Carmona y col 2013). El P-PRP es considerado como un concentrado celular con recuentos plaquetarios no superiores a 5 veces comparado con el conteo de estos mismos fragmentos citoplásmicos en la sangre entera, y con concentraciones leucocitarias no superiores a 3 veces respecto del conteo de estas mismas células en la sangre entera (Dohan Ehrenfest y col 2012, Carmona y col 2013). Cabe resaltar que cuando las concentraciones de plaquetas y leucocitos exceden estos límites (de tipo arbitrario) dan como resultado concentrados de plaquetas acuñados con el nombre de plasma rico en plaquetas y leucocitos (L-PRP) (Dohan Ehrenfest y col 2012, Carmona y col 2013).

Es necesario realizar estudios que impliquen la medición de las concentraciones de factores de crecimiento y su cinética de liberación, luego de que el PRP bovino obtenido con citrato de sodio o ACD-A sea activado con sales de calcio o trombina bovina para conocer el perfil proteico de ambos PRP.

Los resultados obtenidos permiten concluir que no existen diferencias para concentrar plaquetas en PRP bovino, mediante el uso de citrato de sodio o ACD-A. No hubo diferencias relacionadas con los parámetros de activación plaquetaria VPM y ADP. Ambos anticoagulantes mantuvieron bajos estos parámetros, con valores similares a los de la sangre entera. Los resultados sugieren la conservación de plaquetas homogéneas y estables estructuralmente en el PRP bovino, especialmente cuando se utilizó citrato de sodio. Por otro lado, ambos anticoagulantes permitieron obtener PRP con un recuento de leucocitos comparable con el conteo de la sangre entera, sin embargo, solo con ACD-A se logró una leve leucorreducción.

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 Sci* 81, 237-245.
- Baksh N, CP Hannon, CD Murawski, NA Smyth, JG Kennedy. 2013. Platelet-rich plasma in tendon models: A systematic review of basic science literature. *Arthroscopy* 29, 596-607.
- Bielecki T, DM Dohan Ehrenfest, PA Everts, A Wiczowski. 2012. The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: New perspectives. *Curr Pharm Biotechnol* 13, 1153-1162.
- 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.
- Carmona JU, C López, CE Giraldo. 2011. Use of autologous platelet concentrates as regenerative therapy for chronic diseases of the equine musculoskeletal system. *Arch Med Vet* 43, 1-10.
- Carmona JU, C López, JA Sandoval. 2013. Review of the currently available systems to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. *Rec Pat Reg Med* 3, 148-159.
- Dohan Ehrenfest DM, T Bielecki, A Mishra, P Borzini, F Inchingolo, G Sammartino, L Rasmussen, PA Everts. 2012. In Search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 13, 1131-1137.
- Giraldo CE, C López, ME Álvarez, IJ Samudio, M Prades, JU Carmona. 2013. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res* 9, 1-10.
- Lei H, L Gui, R Xiao. 2009. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem* 42, 1452-1460.
- López-Plandolit S, MC Morales, V Freire, J Etxebarria, JA Durán. 2010. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea* 29, 843-848.
- López C, CE Giraldo, JU Carmona. 2012. Evaluation of a double centrifugation tube method for concentrating bovine platelets: Cellular study. *Arch Med Vet* 44, 109-115.
- Martínez-Zapata MJ, AJ Martí-Carvajal, I Solà, JA Expósito, I Bolívar, L Rodríguez, J García. 2012. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 10.
- Mazzucco L, V Balbo, E Cattana, R Guaschino, P Borzini. 2009. Not every PRP-gel is born equal Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet®, RegenPRP-Kit®, Plateltex® and one manual procedure. *Vox Sanguinis* 97, 110-118.
- McCarrel TM, T Minas, LA Fortier. 2012. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am* 94, e143.141-e143.148.
- Mehta SK, A Sood, SS Lin. 2012. Role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery: Current concepts. *Tech Foot Ankle Surg* 11, 3-8.

- Rodrigues SV, AB Acharya, SL Thakur. 2012. Platelet-rich plasma. A review. *NY State Dent J* 78, 26-30.
- Silva RF, CMF Rezende, FO Paes-Leme, JU Carmona. 2011^a. Evaluation of the tube method for concentrating canine platelets: Cellular study. *Arch Med Vet* 43, 95-98.
- Silva RF, CMF Rezende, FO Paes-Leme, JU Carmona. 2011^b. Evaluation of the tube method for concentrating feline platelets: Cellular study. *Arch Med Vet* 43, 187-190.
- Silva RF, JU Carmona, CMF Rezende. 2012. The use of intra-articular platelet rich-plasma as a postsurgical treatment of cranial cruciate ligament rupture in a dog. *Arq Bras Med Vet Zootec* 64, 847-852.
- Sommeling CE, A Heyneman, H Hoeksema, J Verbelen, FB Stillaert, S Monstrey. 2013. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 66, 301-311.
- Vasconcelos E, AC Figueiredo, J Seghatchian. 2003. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and Apheresis. *Transfus Apher Sci* 29, 13-16.