

**Universidad Cardenal Herrera – CEU
CEU Escuela Internacional de Doctorado
(CEINDO)**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA
SALUD**



**Protocolo de Obtención de Plasma Rico en
Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris
catus*) y su Relación con Enfermedades
Víricas Felinas (Leucemia e
Inmunodeficiencia)**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Laura Miguel Pastor

Dirigida por:

Joaquín Jesús Sopena Juncosa

Mónica Rubio Zaragoza

VALENCIA

2023

TESIS DOCTORAL
Laura Miguel Pastor
2023

JOAQUÍN JESÚS SOPENA JUNCOSA Y MÓNICA RUBIO ZARAGOZA, DOCTORES EN VETERINARIA Y PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada **“Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)”** de la que es autora **Doña Laura Miguel Pastor**, Licenciada en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en la Escuela Internacional de Doctorado CEINDO en el marco del Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de la Salud, dentro de la Línea de Investigación de Patología y Sanidad Humana y Animal, y reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada ante el tribunal correspondiente a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos el presente en Alfara del Patriarca, a 16 de noviembre de 2023.



Fdo: Dr. Joaquín Jesús Sopena Juncosa



Dra. Dª. Mónica Rubio Zaragoza

*A mi abuelo Pastor,
sé la ilusión que te hacía que fuera Doctora.*

Agradecimientos

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Agradecimientos

Durante el desarrollo de esta Tesis he compartido emociones que me envuelven en la montaña. El primer paso de toda aventura que merezca ser recordada consiste en diseñar y programar la ruta. Diré que el inicio de esta Tesis no fue nada fácil: la escasa bibliografía documentada acerca del PRP en gatos ya me advertía que estaba abriendo nuevas sendas científicas y que el paseo se acabaría convirtiendo en una gran travesía. ¡Qué complejas son las plaquetas felinas!

Sigamos. Toda buena ruta merece ser compartida. Por ello, durante el camino a la cima, lo fundamental es rodearte de las personas adecuadas, vas a necesitar momentos de conversar, reflexionar, compartir experiencias, discutir senderos... y diré, que he encontrado esa ayuda en cada uno de mis compañeros del grupo de investigación.

Cuando inicias el camino por el valle te sientes ilusionada, relajada, tranquila, observas... hay muchas personas que te acompañan al inicio de la ruta. Por ello me gustaría, igualmente, agradecer a aquellos que me ayudasteis en el principio de este proyecto por breve que fuera, ¡gracias!

Después de la llanura del valle, llega el pie de la montaña, ¡qué pequeña te sientes! Varias veces he pensado << ¡qué duro va a ser llegar hasta ahí arriba!>>, pero con empujones de tus compañeros comienzas a subir poco a poco por la ladera inclinada de esa montaña, cada uno a su ritmo, pero todos pendientes del resto, como un bloque firme que, tras grandes esfuerzos, te hacen vencer esa ladera. Entonces te paras satisfecha, respiras hondo, sonríes y observas el valle, ¡qué lejos se ve y qué pequeños parecen ahora esos senderistas! Un empujón más, unos metros más y, por fin, coronas la gran cima, ¡lo conseguimos!

Ahora dedicaré unas palabras a mis serpas.

En primer lugar, gracias a mis directores de Tesis, Mónica y Joaquín, por arroparme y guiarme a lo largo de estos años, por hacerlo posible.

Gracias, Katy por tu enorme apoyo y ayuda, por tu implicación y enseñarme a escribir mejor. Para mí has sido la tercera directora de esta Tesis.

Gracias al grupo de Investigación del que formo parte, BIOMED-SURGERY, a todos y cada uno de vosotros: Chema, Moni, Joaquín, Elena, Débora, Katy, Ángel, Marta, Ayla, Pau, Belén y a las benjamins del grupo Emma y Gemma, por vuestro apoyo, dedicación e implicación, ¡cuántos proyectos nos quedan por delante!

Muchísimas gracias a la Fundación García-Cugat, por su financiación e ilusión mostrada en este proyecto. Vosotros sois los padrinos de esta Tesis.

Gracias al CEU y a la escuela internacional de Doctorado CEINDO, por hacer posible este proyecto.

A mis peluditos Cooper y Gustavo, siempre tan incondicionales, ¡cuántas personas deberían aprender de los perros!

A Limón, y al igual que a él, a cada uno de los gatos que, en contra de su voluntad, han hecho posible la fase experimental de esta Tesis. ¡Gracias!

A mi familia en general, pero especialmente a mi tía Lolita y a mis primas, Nieves y María José, siempre dispuestas a escuchar y conversar.

A papá y a mamá, por haber construido en gran parte la persona que soy y por haberme transmitido grandes valores en la vida. Gracias por hacer posible mi sueño de ser veterinaria. Esta Tesis es, sobre todo, vuestra.

A mi hermano: sabes que junto a papá sois los hombres de mi vida.

A María, siempre con palabras amables, empática y cariñosa, ¡bienvenida a la familia!

A mis compañeras del servicio de medicina interna del HCV-CEU: Espe, Isa, Marta y Álamo, hacéis que el trabajo sea divertido a la vez que serio. No podría tener mejores compañeras y eso es, principalmente, porque ante todo sois buenas amigas.

Al resto de compañeros del HCV-CEU.

A Belén. Quién nos iba a decir cuando empezamos el internado en el *hospi* que íbamos a ser grandes amigas, no me faltes nunca.

A Ali, porque eres la persona más positiva que conozco y siempre consigues sacar lo mejor de las personas. Contigo siempre hay alegría, echo de menos tenerte más cerca.

A Xaro, por tu eterna sonrisa y saber cómo disfrutar de la vida.

A Pau, siempre dispuesto a escuchar, a dar un abrazo y, aunque me ría de tu consejo, es algo que he empezado a aplicar: <<de trás del uno el dos, Lauri>>.

A Ayla, porque sabes dar consejos y ya lo dicen: la vida aprieta, pero no ahoga.

A los otros compis del CEU: Pascual, Jordi, Juanjo, Aloma, M^a López, M^a García, M^a Descalzo, entre otros, por preguntarme y animarme.

A mis amigos y compañeros de promoción: Bego, Borrell, Marcos y Luis. Gracias a vosotros he aprendido que las parejas y los colegas van y vienen, pero los buenos amigos siempre se quedan. Gracias por todos los momentos juntos desde hace casi 20 años, las risas, lloros y «broncas» (sabios consejos). ¡Larga vida!

Ai mie cari amici italiani: Roby, Francesco, Giulia, Marco e alle piccole bambine Chiara e Agnese. Siete sempre molto gentili con me e fate che a l' Italia mi trovo sempre a casa, siete la mia famiglia là, grazie di cuore per eserci!! Vi voglio bene!!

A Pauly, porque desde los 16 años siempre estás al otro lado del teléfono, dispuesta a un café, una cerveza o una cena con tal de vernos y darnos un abrazo.

A Carla, porque puede pasar tiempo sin que hablemos, pero cuando retomamos el contacto es como si no hubiera pasado el tiempo. Puedo decir con orgullo que eres de mis mejores amigas y una persona a la que admiro mucho.

A Clara, ¡la próxima tesis la tuya!

A mis excompañeros de la clínica veterinaria La Granja y El Pinar, porque siempre hay buen rollo y muchas risas cuando nos juntamos.

A mis amigos de rutas, torrà y viajes de montaña: Irene, Javi, Alba, Adri, Víctor, Andrea, Javi H., Antonio y Sara, todos diferentes, pero formando una gran familia. Con vosotros los problemas se olvidan. ¡Todavía nos quedan muchas suelas que fundir!

En general a cada persona que me ha ayudado aportando su granito de arena.

“Cerca de la cima siempre hay mil excusas para bajarse y una sola razón para subir” (R.P).

Índices

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Índice de Contenido

Introducción General	1
Hipótesis y Objetivos	5
Hipótesis de trabajo	7
Objetivos	9
Revisión Bibliográfica	11
Plasma Rico en Plaquetas (PRP)	13
Plaquetas en la cicatrización de heridas y medicina regenerativa	15
Principales efectos de los factores de crecimiento	16
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	16
Factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1)	16
Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	17
Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	17

Factor de crecimiento hepatocítico (HGF) _____	17
Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) _____	17
Factor de crecimiento epitelial (EGF) _____	17
Factor de crecimiento insulínico-I y II (IGF-I, II) _____	18
Tipos de PRP _____	18
PRGF®-Endoret® _____	23
Gatos _____	27
PRP en gatos _____	27
Plaquetas en gatos _____	30
Virus de la leucemia felina (FeLV) _____	32
Epidemiología y transmisión _____	32
Patogenia _____	33
Prevalencia _____	34
Signos clínicos _____	34
Diagnóstico _____	34
Virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) _____	36
Epidemiología y transmisión _____	36
Patogenia _____	36
Prevalencia _____	37
Signos clínicos _____	38
Diagnóstico _____	38
Material y Métodos _____	41
Materiales _____	43
Modelo animal _____	44
Criterios de inclusión _____	44
Criterios de exclusión _____	44
Equipos _____	46
Material fungible _____	46
Soluciones y fármacos _____	47
Métodos _____	49
Recolección de sangre _____	50
Preparación del PRP _____	50
Análisis hematológico _____	54
Cuantificación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) y factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) _____	56
Método estadístico _____	56

Resultados	59
Objetivo 1: Estandarización del protocolo PRGF® en gatos	63
Estudio descriptivo de los animales	63
Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP	64
Concentración de PLTs, agregados plaquetares y VPM	64
Plaquetas	64
Agregados plaquetares	66
Volumen plaquetar medio (VPM)	67
Concentración de RBCs	68
Concentración WBCs	69
Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC	74
PDGF-BB	74
TGF-β1	75
Objetivo 2: Evaluación del Plasma Rico en Plaquetas (PRGF®-Endoret®) en gatos con leucemia: Valoración de PDGF-BB y TGF-β1	77
Estudio descriptivo de los animales	77
Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP	78
Concentración de PLTs, agregados plaquetares y VPM	78
Plaquetas	78
Agregados plaquetares	79
VPM	80
Concentración de RBCs	80
Concentración de WBCs	81
Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC	85
PDGF-BB	85
TGF-β1	86
Objetivo 3: Caracterización del PRGF en gatos infectados por el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV): análisis celular y de los factores de crecimiento PDGF-BB y TGF-β1	89
Estudio descriptivo de los animales	89
Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP	90
Concentración de PLTs, agregados plaquetares y VPM	90
Plaquetas	90

Agregados plaquetares _____	91
Volumen plaquetar medio (VPM) _____	91
Concentración de RBCs _____	92
Concentración de WBCs _____	93
Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC _____	96
PDGF-BB _____	96
TGF- β 1 _____	97
Discusión _____	99
Estudio 1: Optimización del protocolo PRGF® en gatos _____	103
Concentración plaquetar _____	103
Pureza del PRP obtenido _____	105
Agregación plaquetar y VPM _____	111
Caracterización de factores de crecimiento: PDGF-BB y TGF- β 1 _____	113
Estudio 2: Evaluación del Plasma Rico en Plaquetas (PRGF®-Endoret®) en gatos con leucemia: Valoración de PDGF-BB y TGF-β1. _____	115
Concentración plaquetar _____	116
Pureza del PRP obtenido _____	118
Agregación plaquetar y VPM _____	120
Caracterización de factores de crecimiento: PDGF-BB y TGF- β 1 _____	121
Estudio 3: Caracterización del PRP en gatos infectados por el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV): análisis celular y de los factores de crecimiento PDGF-BB y TGF-β1 _____	123
Concentración plaquetar _____	125
Agregación plaquetar y VPM _____	127
Caracterización de factores de crecimiento: PDGF-BB y TGF- β 1 _____	129
Conclusiones _____	131
Limitaciones del estudio y futuras líneas de investigación _____	135
Limitaciones del estudio _____	137
Futuras líneas de investigación _____	139
Resumen _____	141
Summary _____	146
Bibliografía _____	151

Anexos	167
Artículos Publicados	169
Anexo 1. Evaluation of a Standardized Protocol for Plasma Rich in Growth Factors Obtention in Cats: A Prospective Study	169
Anexo 2. Evaluation of Platelet-Rich Plasma by means of PRGF®-Endoret® protocol in leukemia cats: PDGF-BB and TGF-β1 valuation	169

Índice de Tablas

<i>Tabla 1: Parámetros analíticos medidos en cada paciente para evaluar su estado de salud.</i>	45
<i>Tabla 2: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de PLTs (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.</i>	64
<i>Tabla 3: Estudio descriptivo y comparativo de VPM (fL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación</i>	68
<i>Tabla 4: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de RBCs (M/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.</i>	68
<i>Tabla 5: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de WBCs (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.</i>	69
<i>Tabla 6: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de LYMPH (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.</i>	71

<i>Tabla 7: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de NFS (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación</i>	72
<i>Tabla 8: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de MON (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación</i>	73
<i>Tabla 9: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de PDGF-BB (pg/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.</i>	74
<i>Tabla 10: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de TGF-β1 (pg/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.</i>	75
<i>Tabla 11: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de PLTs (K/mL) en gatos FeLV en los diferentes protocolos de centrifugación</i>	78
<i>Tabla 12: Estudio descriptivo y comparativo de VPM (fL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	80
<i>Tabla 13: Estudio descriptivo y comparativo de RBCs (M/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	80
<i>Tabla 14: Estudio descriptivo y comparativo de WBCs (K/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	81
<i>Tabla 15: Estudio descriptivo y comparativo de LYMPH (K/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	82
<i>Tabla 16: Estudio descriptivo y comparativo de NFS (K/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	83
<i>Tabla 17: Estudio descriptivo y comparativo de MON (K/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	84
<i>Tabla 18: Estudio descriptivo y comparativo de PDGF-BB (pg/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.</i>	85
<i>Tabla 19: Estudio descriptivo y comparativo de TGF-β1 (pg/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	86
<i>Tabla 20: Estudio descriptivo y comparativo de PLTs (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	90
<i>Tabla 21: Estudio descriptivo y comparativo de VPM (fL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas</i>	91

<i>Tabla 22: Estudio descriptivo y comparativo de RBCs (M/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.</i>	92
<i>Tabla 23: Estudio descriptivo y comparativo de WBCs (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.</i>	93
<i>Tabla 24: Estudio descriptivo y comparativo de LYMPH (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.</i>	94
<i>Tabla 25: Estudio descriptivo y comparativo de NFS (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.</i>	95
<i>Tabla 26: Estudio descriptivo y comparativo de MON (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.</i>	96
<i>Tabla 27: Estudio descriptivo y comparativo de PDGF-BB (pg/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.</i>	97
<i>Tabla 28: Estudio descriptivo y comparativo de TGF-β1 (pg/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.</i>	98

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Interpretación prueba SNAP® IDEXX FeLV/FIV</i>	45
<i>Figura 2. Formación de coágulo de fibrina tras la centrifugación de la muestra. Muestra no válida.</i>	46
<i>Figura 3. Equipo para preparación PRGF®-Endoret®</i>	47
<i>Figura 4. Obtención de PRGF®-Endoret®</i>	52
<i>Figura 5. Esquemmatización del diseño del estudio: obtención de muestras de sangre, centrifugación siguiendo los tres protocolos mediante la metodología PRGF®-Endoret®, obtención de las fracciones PRP y PPP, posterior activación de ambas fracciones con activador BTI®</i>	53
<i>Figura 6. Esquemmatización del diseño del estudio en gatos FeLV: obtención de muestras de sangre, centrifugación siguiendo el protocolo elegido cumpliendo la metodología PRGF®-</i>	

<i>Endoret®</i> , obtención de las fracciones PRP y PPP, posterior activación de ambas fracciones con activador BTI® y congelación a -80°C para su posterior análisis de FC _____	54
<i>Figura 7. Esquematización del diseño del estudio en gatos FIV: obtención de muestras de sangre, centrifugación siguiendo el protocolo elegido cumpliendo la metodología PRGF®-Endoret®, obtención de las fracciones PRP y PPP, posterior activación de ambas fracciones con activador BTI® y congelación a -80°C para su posterior análisis de FC _____</i>	
_____	55
<i>Figura 8. Evaluación de la concentración de PLTs en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra _____</i>	
_____	66
<i>Figura 9. Presencia de agregados plaquetares en las muestras de gatos sanos _____</i>	
_____	67
<i>Figura 10. Evaluación de la concentración de RBCs en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra _____</i>	
_____	69
<i>Figura 11. Evaluación de la concentración de WBCs en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra _____</i>	
_____	70
<i>Figura 12. Evaluación de la concentración de LYMPH en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra _____</i>	
_____	71
<i>Figura 13. Evaluación de la concentración de NFS en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra _____</i>	
_____	72
<i>Figura 14. Evaluación de la concentración de MON en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra _____</i>	
_____	73
<i>Figura 15. Evaluación de la concentración de PDGF-BB según protocolo de centrifugación en los diferentes tipos de fracción plasmática _____</i>	
_____	75
<i>Figura 16. Evaluación de la concentración de TGF-β1 según protocolo de centrifugación en los diferentes tipos de fracción plasmática _____</i>	
_____	76
<i>Figura 17. Evaluación de la concentración de PLTs en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo. _____</i>	
_____	79
<i>Figura 18. Presencia de agregados en muestras de gatos FeLV _____</i>	
_____	79
<i>Figura 19. Evaluación de la concentración de RBCs en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo. _____</i>	
_____	81
<i>Figura 20. Evaluación de la concentración de WBCs en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo. _____</i>	
_____	82

<i>Figura 21. Evaluación de la concentración de LYMPH en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo</i>	83
<i>Figura 22. Evaluación de la concentración de NFS en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo</i>	84
<i>Figura 23. Evaluación de la concentración de MON en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo</i>	85
<i>Figura 24. Evaluación de la concentración de PDGF-BB en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo</i>	86
<i>Figura 25. Evaluación de la concentración de TGF-β1 en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo</i>	87
<i>Figura 26. Evaluación de la concentración de PDGF-BB en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo</i>	90
	90
<i>Figura 27. Presencia de agregados en muestras de gatos FIV</i>	91
<i>Figura 28. Evaluación de la concentración de RBCs en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo</i>	92
<i>Figura 29. Evaluación de la concentración de WBCs en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo</i>	93
<i>Figura 30. Evaluación de la concentración de LYMPH en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo</i>	94
<i>Figura 31. Evaluación de la concentración de NFS en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo</i>	95
<i>Figura 32. Evaluación de la concentración de MON en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo</i>	96
<i>Figura 33. Evaluación de la concentración de PDGF-BB en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo</i>	97
<i>Figura 34. Evaluación de la concentración de TGF-β1 en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo</i>	98

Listado Abreviaturas

**Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)
en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con
Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)**

Listado de abreviaturas

A continuación, se detallan todas las abreviaturas que aparecen a lo largo del documento:

- AAFP: *American Association of Feline Practitioners*
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADP: Adenosina difosfato
- AINES: Antiinflamatorios no esteroideos
- ATP: Adenosina trifosfato
- BAS: Basófilos
- BE: Bromuro de etidio
- CH: Contenido medio de hemoglobina
- CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- EEUU: Estados Unidos
- EGF: Factor de crecimiento epitelial

- ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
- EM: Esclerosis múltiple
- EOS: Eosinófilos
- FC: Factores de crecimiento
- FC: Frecuencia cardiaca
- FeLV: Virus de la leucemia felina
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
- FHV-1: Herpesvirus felino
- FIV: Virus de la inmunodeficiencia felina
- fL: Femtolitro
- FR: Frecuencia respiratoria
- FvW: Factor de Von Willebrand
- g: Fuerza de centrifugación o fuerza gravitacional
- gp: Glucoproteína
- h: Horas
- HB: Hemoglobina
- HDW: Ancho de distribución de la concentración de hemoglobina
- HGF: Factor de crecimiento hepatocítico
- IGF-I, II: Factor de crecimiento insulínico-I, II
- IM: Intramuscular
- IV: Intravenosa
- kDa: Kilodaltons
- L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos
- L-PRP: Plasma rico en plaquetas y leucocitos
- LYMPH: Linfocitos
- MACD7: Anticoagulante ácido citrato dextrosa
- MCH: Volumen de hemoglobina corpuscular
- MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media
- mL: Mililitros
- mm: Milímetros
- MO: Médula ósea
- MON: Monocitos
- NFS: Neutrófilos
- °C: Grados centígrados

- P-PRF: Fibrina rica en plaquetas
- P-PRP: Plasma rico en plaquetas puro
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato
- PCR: Reacción en cadena a la polimerasa
- PCV: Paquete de células
- PDGF-AA: Factor de crecimiento derivado de plaquetas - AA
- PDGF-AB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas - AB
- PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas - BB
- PGE1: Prostaglandina E1
- PLTs: Plaquetas
- PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento
- PRP: Plasma Rico en Plaquetas
- RBCs: Glóbulos rojos
- RDW: Ancho de distribución de eritrocitos
- RET: Reticulocitos
- rpm: Revoluciones por minuto
- SNC: Sistema nervioso central
- TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta-1
- TRC: Tiempo de relleno capilar
- VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial
- VPM: Volumen plaquetar medio
- WBCs: Glóbulos blancos

Introducción General

**Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)
en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con
Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)**

Introducción

La obtención de hemoderivados como el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y su aplicación clínica se emplea desde hace más de dos décadas como terapia en patologías degenerativas e inflamatorias (Anitua, Andia et al. 2004, Weyrich and Zimmerman 2004). Las plaquetas (PLTs) de los mamíferos son células sin núcleo que se liberan a la sangre a partir de precursores de megacariocitos en la médula ósea (MO) durante la trombopoyesis. El tiempo de maduración de los megacariocitos y, por tanto, liberación de las PLTs es de aproximadamente 5 días. La vida útil de las PLTs varía entre especies, siendo en el perro de $6 \pm 1,1$ días. Sin embargo, se desconoce de este dato en gatos (Gant, McBride et al. 2020). El tamaño plaquetar también varía entre especies y razas (Lawrence, Chang et al. 2013). Las PLTs de los gatos presentan un tamaño superior en comparación a otras especies (Boudreaux, Osborne et al. 2010), siendo otra particularidad de las PLTs del gato la tendencia a agregarse y formar agregados plaquetares tras la extracción sanguínea. Esto resulta en numerosas ocasiones en un conteo plaquetar menor

incorrecto considerándose como pseudotrombocitopenia (Knoll and Rowell 1996, Moritz and Hoffmann 1997, Zelmanovic and Hetherington 1998, Norman, Barron et al. 2001, Norman, Barron et al. 2001).

Las PLTs desempeñan un rol esencial en la hemostasia mediante un equilibrio entre estimulación e inhibición plaquetar (Maureen 2005). La hemostasia se desarrolla a diario cuando ocurre un daño en el endotelio por venopunción, agentes infecciosos, acidosis, hipoxia, inflamación, hipotensión o simplemente muerte celular de células propias del endotelio (Ruiz-Copegui 2000). Múltiples situaciones clínicas pueden afectar a la función de las PLTs: enfermedades como fallo renal, enfermedad cardíaca, endocrinopatías (diabetes mellitus, hiperadrenocorticismos), pancreatitis necrotizante, neoplasias, sepsis o anemia hemolítica inmunomediada entre otras o, la administración de ciertos fármacos como antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Maureen 2005). La capacidad de reacción de las PLTs se debe a la composición en su citoplasma de gránulos alfa y delta. Los gránulos alfa contienen en su interior fibronectina, factor de Von Willebrand (FvW), factores de coagulación (V y VIII) y factores de crecimiento (FC). Los gránulos delta contienen adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), histamina, epinefrina, serotonina y calcio. Los FC facilitan el crecimiento de células endoteliales vasculares, células del músculo liso vascular y fibroblastos (Klinger and Jelkmann 2002, Meseguer, Esteban et al. 2002, Vincent, Yagushi et al. 2002).

PRGF®-Endoret® ha proporcionado tecnología precisa para la obtención de este hemoderivado rico en FC para uso clínico en curación de heridas, regeneración de tejidos, implantología oral, ortopedia y medicina deportiva, así como tratamiento de úlceras corneales entre otros estudios (Anitua, Sánchez et al. 2006, Anitua, Sánchez et al. 2007).

La obtención de estos FC está ampliamente estudiada en algunas especies como son el perro (Cuervo, Rubio et al. 2014), caballo (Angelone, Conti et al. 2017), conejo (Chicharro, Carrillo et al. 2018, Chicharro-Alcántara, Rubio-Zaragoza et al. 2018, Torres-Torrillas, Damiá et al. 2021, Torres-Torrillas, Damiá et al. 2022) (Chicharro, Carrillo et al. 2018, Chicharro-Alcántara, Rubio-Zaragoza et al. 2018, Torres-Torrillas, Damiá et al. 2021, Torres-Torrillas, Damiá et al. 2022) y sobre todo humano (Anitua, Sanchez et al. 2012, Giacomello, Giacomello et al. 2015, Vaquerizo, Padilla et al. 2018, Anitua, Muruzábal et al. 2019, Navarro, Pino et al. 2020, Giacomello, Mortellaro et al. 2021, Rahhal-Ortuño, Fernández-Santodomingo et al. 2021, Soares and Prazeres Lopes 2021). En especies como el perro y el caballo ya se emplea terapia regenerativa con PRGF en ortopedia como tratamiento efectivo de la artrosis y regeneración de cartílago articular o de las laminitis, respectivamente. No obstante, son muy pocos los estudios

relacionados en gatos y los protocolos de obtención están lejos de ser estandarizados y contrastados (Silva, Alvarez et al. 2012, Silva, Carmona et al. 2012, Chun, Canapp et al. 2020, Ferrari and Schwartz 2020).

La diferencia de tamaño y peso de las PLTs entre especies hace necesario estandarizar un protocolo de centrifugación sanguínea para obtener PRP específico de especie (Clemmons, Bliss et al. 1983).

Actualmente existen trabajos publicados donde recomiendan velocidades y tiempos de centrifugación en gatos basando los resultados de obtención de PRP en contaje de las PLTs exclusivamente (Silva, Rezende et al. 2011, Oliver Ballester, García De Carellán Mateo et al. 2017, Chun, Canapp et al. 2020, Ferrari and Schwartz 2020). Hasta el momento, sólo hay un artículo publicado (Silva, Alvarez et al. 2012) donde se estudió la concentración y liberación de los factores de crecimiento (FC) en el plasma, pero este estudio, no obtuvo las características óptimas de PRGF®-Endoret® (incremento de concentrado plaquetar y FC respecto al valor basal, con ausencia de glóbulos rojos (RBCs) y glóbulos blancos (WBCs) (Anitua, Sánchez et al. 2007, Anitua, Sánchez et al. 2008, Anitua, Zalduendo et al. 2013).

Conociendo el beneficio que supone emplear el PRP como terapia en enfermedades de carácter inflamatorio y degenerativo en especies como el caballo, perro y humano entre otras, hace pensar que el empleo de este hemoderivado puede resultar beneficioso también en el gato (Silva, Alvarez et al. 2012, Silva, Carmona et al. 2013). Sin embargo, no existe en la bibliografía ningún protocolo estandarizado ni ningún sistema probado para la obtención de PRP y FC en el gato. Un estudio publicado por el Hospital Clínico de la Universidad de Pádova (Italia) demostró la curación de heridas en un gato empleando PRP canino (Gemignani, Perazzi et al. 2017). Si bien es cierto, no hay estudios suficientes, lo que hace necesario desarrollar más trabajos que evalúen la eficacia clínica del uso de PRP en gatos (Silva, Rezende et al. 2011, Silva, Alvarez et al. 2012, Silva, Carmona et al. 2012, Silva, Carmona et al. 2013, Chun, Canapp et al. 2020, Ferrari and Schwartz 2020).

Los protocolos de centrifugación sanguínea propuestos en el presente proyecto pretenden alcanzar un PRP y, por tanto, un PRGF, en ausencia de WBCs y RBCs con un número de PLTs en 1,5-2,5 veces las PLTs basales de acuerdo con los estándares del PRGF®Endoret® ya estandarizado en otras especies, incluida la humana (Anitua, Sánchez et al. 2008, Anitua, Zalduendo et al. 2013). La eliminación de WBCs de este hemoderivado asegura una mejor regeneración tisular y disminución de la inflamación controlando el dolor al disminuir el número de citoquinas proinflamatorias presentes (Beldon 2010, Riond, Waßmuth et al. 2015). No

obstante, en la actualidad, la inclusión de WBCs en el PRP sigue siendo un tema de controversia, defendido por diversos autores (Bierie and Moses 2006, Halpin, Saunders et al. 2016).

Otro de los objetivos que pretende evaluar este proyecto es la relación existente entre dos de las enfermedades víricas más comunes en gatos: leucemia felina (FeLV) e inmunodeficiencia felina (FIV) y la calidad del PRGF obtenido, ya que estas enfermedades predisponen a patologías de carácter inflamatorio, inmunomediado y tumoral (Weiser and Kociba 1984, Hart and Nolte 1991, Russel 2010), pudiendo alterar las características del PRGF descrito anteriormente (Anitua, Sánchez et al. 2008).

De esta manera, el proyecto pretende establecer el protocolo de obtención del PRGF en el gato, cumpliendo los parámetros establecidos en la técnica PRGF®Endoret® (Anitua, Sánchez et al. 2008) y una vez definido, valorar el efecto que pueden tener dos de las patologías víricas más comunes en el gato, la leucemia e inmunodeficiencias felinas, en la composición del plasma. Poder definir el protocolo de obtención de FC en esta especie animal, supone un nuevo campo de investigación en cuanto a aplicación clínica en distintas patologías de carácter degenerativo e inflamatorio.

Hipótesis y Objetivos

**Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)
en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con
Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)**

Hipótesis de trabajo

La tecnología PRGF®-Endoret® se emplea con éxito en el campo de la medicina y cirugía humana y animal como tratamiento de diferentes patologías. Sin embargo, en el gato no se ha documentado ningún estudio acerca del uso de este hemoderivado que cumpla la tecnología PRGF®-Endoret®. Las hipótesis de trabajo que surgen en este proyecto de investigación son que, al igual que en otras especies, es posible obtener un protocolo de centrifugación de la sangre en gatos a partir del cual se obtenga plasma rico en plaquetas (PRP) y, por tanto, rico en factores de crecimiento (FC). Otra hipótesis planteada en este estudio es que, enfermedades víricas felinas, como la leucemia y la inmunodeficiencia felinas, podrían afectar la calidad de este derivado sanguíneo, ya que estas enfermedades predisponen a patologías de carácter inflamatorio, inmunomediado y tumoral, pudiendo alterar las características del PRGF descrito anteriormente.

Objetivos

El objetivo principal que desea alcanzar este proyecto es la estandarización de un protocolo de obtención de PRP en el gato que cumpla con las condiciones de PRGF®-Endoret® de la manera más eficiente, basándonos en el concentrado de PLTs y la ausencia de RBCs y WBCs, así como evaluar la concentración de dos de los FC más estudiados, el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF-β1) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas tipo B (PDGF-BB).

Una vez alcanzado el objetivo principal, el trabajo se centrará en determinar la relación que existe entre FeLV y cómo esta enfermedad puede afectar a la calidad del PRGF®-Endoret® y, determinar la relación existente entre FIV y cómo este virus afecta a la calidad del PRGF®-Endoret®.

Revisión Bibliográfica

**Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)
en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con
Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)**

Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

La investigación multidisciplinar se encuentra en continuo desarrollo debido a la gran cantidad de áreas en investigación en este campo. Las terapias biológicas en medicina regenerativa se dividen principalmente en cuatro categorías: terapia genética, ingeniería tisular, terapia celular y PRP (Andía, Rubio-Azpeitia et al. 2015). El enfoque moderno de la medicina regenerativa tiene como uno de los objetivos principales conseguir una baja invasión y una alta curación clínica en sus tratamientos, donde hemoderivados como PRP, Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) y Plasma Rico en Fibrina (PRF), desempeñan un papel revelador (Giannini, Cielo et al. 2015).

Por definición, el PRP es un derivado sanguíneo autólogo obtenido tras un proceso de centrifugación de la sangre del paciente que permite obtener una fracción plasmática con una concentración de PLTs superior a la basal (Marx 2004). Fue Kingsley en 1954 quien atribuyó a este hemoderivado el nombre de “plasma rico en plaquetas” en una publicación acerca de la coagulación de la sangre y el factor VI en humana (Kingsley 1954). Según bibliografía,

inicialmente este concentrado plaquetar se empleaba para favorecer y potenciar la acción de la fibrina y no con fines en la curación de los tejidos (Silverberg, Harbury et al. 1977).

El PRP, además de una mayor concentración de PLTs en su composición, contiene también FC que son secretados activamente por las PLTs. Además, las PLTs son ricas en proteínas como la fibrina y fibronectina que actúan a nivel de la adhesión celular. De este modo, proporciona el soporte estructural necesario para la migración de las células, así como la expansión y desarrollo tridimensional de los tejidos sobre los que actúa. Por todo ello, el PRP ha demostrado tener no solo efecto sobre las células diana para los FC, si no que funciona como una matriz extracelular potenciando la reparación y regeneración de muchos tejidos (Marx 2004, Mehta and Watson 2008).

Debido a la variabilidad de productos obtenidos, décadas después surgió la necesidad de establecer una clasificación del PRP obtenido en base a su composición (Dohan Ehrenfest, Rasmusson et al. 2009, Dohan Ehrenfest, Andia et al. 2014) y a la metodología de obtención, tal y como describiremos más adelante. En los últimos 30 años ha surgido un interés considerable en el potencial del PRP autólogo con fines curativos en el campo de la medicina regenerativa (Everts, van Zundert et al. 2008).

En su interior, las PLTs contienen gránulos α que al activarse liberan al medio sustancias activas como quimiocinas, citoquinas y FC, entre otros. Algunos de los FC más importantes liberados por las PLTs en PRP incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, AA-BB-AB), el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el factor de crecimiento insulínico-I y II (IGF-I, II). Estos polipéptidos solubles, descubiertos por Canalis en 1988, actúan como agentes reguladores de la proliferación, diferenciación y metabolismo celular, involucrados por tanto en la restauración tisular y la inmunomodulación (Marx 2001, Blair and Flaumenhaft 2009, Dohan Ehrenfest, Bielecki et al. 2012, Heijnen and van der Sluijs 2015, Everts, Onishi et al. 2020). Los FC actúan a nivel de los receptores citoplasmáticos de diversos tipos de células, principalmente en las células mesenquimales. Estas células conforman un tejido primitivo durante el desarrollo embrionario y, a partir de este mesodermo se formarán gran parte de los futuros tejidos del organismo. El tejido mesenquimal está formado por células madre pluripotenciales, que se diferenciarán y especializarán en diferentes tipos de tejidos como tejido conectivo en general, músculo y tejido epitelial (Rodríguez Flores, Palomar Gallego et al. 2012).

Plaquetas en la cicatrización de heridas y medicina regenerativa

Las PLTs provienen de los megacariocitos a nivel de la médula ósea (MO), son células sin núcleo y su vida media es muy corta. En condiciones fisiológicas los valores en sangre periférica abarcan rangos de 150.000 y 400.000 PLTs/uL de sangre. Cuando viajan por los vasos sanguíneos inactivadas tienen una forma discoidal biconvexa, pero al activarse experimentan cambios morfológicos (George 2000). Las PLTs son conocidas principalmente por su papel indispensable en la hemostasia primaria y la trombosis. Sin embargo, la creciente evidencia experimental identifica a estas células como moduladores relevantes de procesos fisiopatológicos como la inflamación y la regeneración tisular (Nurden 2018). Ambos procesos están mediados por la liberación de FC, citoquinas y moduladores de la matriz extracelular que promueven la revascularización del tejido dañado a través de la migración, proliferación, diferenciación y estabilización de las células del endotelio dando lugar a nuevos vasos sanguíneos, la restauración de tejido conectivo dañado mediante la migración, proliferación y activación de los fibroblastos y, en último lugar, promueven la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales en tipos de células específicas de tejido (Xue and Jackson 2015, Rittié 2016, Wu, Mottola et al. 2017).

La cicatrización de heridas es un proceso fisiológico dinámico cuyo objetivo es restaurar la arquitectura normal y funcionalidad del tejido dañado. Primero tiene lugar una fase inflamatoria, donde se formará un tapón plaquetario seguido de la formación de una matriz de fibrina sobre la que se asentarán las primeras células que iniciarán el paso a la cicatrización. Posteriormente comienza la fase de formación de nuevo tejido, donde la angiogénesis tiene una implicación relevante. Es en esta fase donde la matriz de fibrina se reemplaza por tejido de granulación para, finalmente, dar lugar a la fase de remodelación que dependerá de la capacidad de regeneración de cada tejido (Forbes and Rosenthal 2014).

Para disminuir el daño tisular es crucial una resolución rápida de la fase proinflamatoria y la transición a la fase de regeneración (Wu, Mottola et al. 2017). Por ello, el uso de FC presentes en el PRP supone una alternativa que promueve la regeneración de los tejidos. Además de la acción regenerativa propia de las PLTs, éstas contienen quimiocinas y citoquinas que aportan acción antimicrobiana (Fabbro, Bortolin et al. 2016). Este efecto microbicida ha sido demostrado por múltiples estudios. Los gránulos alfa liberan potentes péptidos antimicrobianos que presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram negativos, Gram positivos y hongos (Intravia, Allen et al. 2014). Son diversos los estudios que abalan el efecto antimicrobiano del PRP frente a multitud de microorganismos como: *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli*, *A. baumannii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacterium actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, entre otros, tanto in vitro como in vivo (Bielecki, Gazdzik et al. 2007, Moojen, Everts et al. 2008, Edelblute, Donate et al. 2015, Yang, Hu et al. 2015).

El PRP influye en la migración, proliferación y diferenciación de varios tipos de células. Su aplicación aprovecha las condiciones normales de la curación para potenciar y acelerar la reparación fisiológica además de restaurar la homeostasis tisular (Andia, Rubio-Azpeitia et al. 2015). La curación de los tejidos con PRP se basa en el uso de señales moleculares que el propio organismo utiliza para auto-repararse cuando es dañado (Anitua, Prado et al. 2016). Es por ello por lo que, desde hace más de 3 décadas, este hemoderivado se emplea con éxito en el campo de la medicina regenerativa. Debido a su amplia versatilidad, el PRP se emplea con dominio en múltiples campos médicos como son la traumatología, dermatología, implantología oral u oftalmología, entre otros (Etulain 2018).

Principales efectos de los factores de crecimiento

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Este FC promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos por un mecanismo de quimiotaxis. Este FC es mitógeno de células endoteliales, promoviendo la formación de nuevos capilares además de estimular la proliferación de células mesenquimales indiferenciadas (Anitua 1999). Existen tres tipos: AA, BB y AB. Se ha demostrado que PDGF participa en la mitogénesis de los condrocitos articulares y facilita la formación de colágeno tipo I (Deuel, Huang et al. 1981) y se ha visto involucrado en la remodelación ósea debido a su estimulación de la resorción ósea incrementando el número de osteoclastos (Howes, Bowness et al. 1988, Nash, Howlett et al. 1994, Vikjaer, Blom et al. 1997).

Factor de crecimiento transformante (TGF)

Existen dos tipos de TGF, α y β . Este último es una sustancia polipeptídica que forma parte del grupo de las citoquinas y, en mamíferos existen tres isotipos ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$). TGF- $\beta 1$ se encuentra principalmente en PLTs, linfocitos (LYMPH) y neutrófilos (NFS) y se encuentra involucrado en la multiplicación de células precursoras de los osteoblastos y en la estimulación directa sobre la síntesis de diversos tejidos, principalmente tejido óseo y cartílago. Este polipéptido se ha visto implicado en procesos como la angiogénesis, cicatrización, hematopoyesis, formación de tejido óseo y piel, desarrollo de glándulas mamarias, control de la inflamación y fibrosis, así como en el

desarrollo de neoplasias (Pelletier and Martel-Pelletier 1994, Grageda 2004, Grageda, Lozada et al. 2005, Bierie and Moses 2006, Kofler and Simons 2016).

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Su principal efecto se encuentra relacionado con el aumento de la angiogénesis y permeabilidad de los vasos sanguíneos. Este FC es conocido como uno de los FC proangiogénicos más potentes secretados por las células endoteliales (LeCouter, Lin et al. 2002).

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

El FGF es un FC multifuncional con un alto impacto en la cicatrización tisular. Su efecto ha sido demostrado en diferentes estudios acerca de la cicatrización de heridas y reparación ósea (Gospodarowicz and Cheng 1987). Al mismo tiempo es capaz de promover la proliferación y diferenciación de los condrocitos, por lo que desempeña una labor destacable en la mejora biomecánica de la superficie articular y formación de hueso subcondral (Chuma, Mizuta et al. 2004, Fukuda, Kato et al. 2005, Maddaluno, Urwyler et al. 2017).

Factor de crecimiento hepatocítico (HGF)

El HGF regula el crecimiento celular y la movilidad de células epiteliales y endoteliales, promueve la reparación del tejido y la neovascularización, viéndose implicado positivamente en la cicatrización de heridas y en la regeneración de diversos órganos tras sufrir un daño (Madonna, Cevik et al. 2012). Varios estudios han puesto de manifiesto que, el HGF cuando participa en conjunto con células mesenquimales, desarrolla un efecto anti fibrótico (Liu, Shen et al. 2011, Song, Lee et al. 2012).

Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)

Este factor promueve la angiogénesis, la regeneración de cartílago, la adhesión plaquetaria y la fibrosis (Ivkovic, Yoon et al. 2003, Cicha and Goppelt-Struebe 2009).

Factor de crecimiento epitelial (EGF)

El EGF fue el primer FC en identificarse en el año 1962. Este FC se encuentra implicado en la epitelización y la angiogénesis, además de presentar efectos sobre los fibroblastos y los miocitos (Everts, Onishi et al. 2020).

Factor de crecimiento insulínico-I y II (IGF-I, II)

El IGF-II se encuentra en mayor concentración en la especie animal, sin embargo, la isoforma I es más común en humanos, siendo el tipo I el que presenta un efecto notablemente superior en comparación al tipo II sobre determinados tejidos (Grageda 2004).

Este FC tiene efecto mitogénico sobre múltiples tejidos como el óseo, cartílago (Reckenbeil, Kraus et al. 2017), músculo, nervios, piel, hígado, riñón y pulmón, estimulando el crecimiento de estos (Schmidt, Chen et al. 2006, Trejo, Piriz et al. 2007).

Su efecto acerca de la diferenciación y proliferación mioblástica se demuestra en estudios de modelo animal con efectos positivos sobre la cicatrización de lesiones musculares (Damon, Haugk et al. 1998, Menetrey, Kasemkijwattana et al. 2000).

Tipos de PRP

Existe un gran número de sistemas de obtención de PRP disponibles comercialmente. Estos sistemas difieren en el protocolo de obtención y en el volumen de recolección de PRP, por lo que los hemoderivados presentan propiedades distintas, aunque todos reciban el término de PRP. No existe un consenso claro acerca de la estandarización de los protocolos para el PRP según formulación y aplicaciones clínicas, siendo varios los autores que han puesto de manifiesto la necesidad de crear una clasificación de los subtipos de PRP disponibles. Además, la tecnología PRP sigue avanzando y desarrollándose, sugiriendo la necesidad de diferentes formulaciones según las patologías a tratar. Todo ello conduce a pensar que los parámetros y variables para la producción ideal de PRP continúen creciendo en el futuro (Everts, Onishi et al. 2020).

Teniendo en cuenta el contenido celular y la presencia o ausencia de fibrina, se han identificado cuatro grupos principales de PRP (Kon, Di Matteo et al. 2020):

- Plasma rico en plaquetas puro (P-PRP), contiene una concentración moderada de PLTs libre de WBCs.
- Plasma rico en plaquetas y leucocitos (L-PRP), incluye una fracción de WBCs, pero la matriz de fibrina es escasa.
- Fibrina rica en plaquetas (P-PRF), es un producto sanguíneo con una baja concentración de WBCs y se recoge debido al gel separador específico utilizado en el método, la activación de PLTs y la polimerización de fibrina se consigue utilizando cloruro de calcio.

- Fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF), se considera como concentrado de PLTs de segunda generación porque el concentrado natural se produce sin anticoagulantes ni agentes gelificantes y después de la centrifugación, el coágulo de PRF forma una fuerte matriz de fibrina en la que se concentran la mayoría de las PLTs y WBCs de la sangre recolectada.

Las continuas revisiones de terminología y nuevos criterios de clasificación para bioformulaciones de PRP en medicina regenerativa han permitido identificar hasta 15 tipos de productos PRP con diferencias en la formulación, propiedades biológicas y mecanismos de acción, así como diferentes indicaciones y resultados clínicos (Magalon, Chateau et al. 2016, Everts, van Erp et al. 2021). Alsosou y Harrison establecieron un sistema de clasificación más detallado y completo, incluyendo una combinación de caracteres numéricos y alfabéticos para identificar la clase de PRP basada en la presencia o ausencia de leucocitos (L o P), el contenido de fibrina (alto: PRF; bajo: PRP), activado o no activado (I o II), concentración plaquetaria (A: $<900 \times 10^3$ PLTs/ μ L; B: $900-1700 \times 10^3$ PLTs/ μ L; C: $>1700 \times 10^3$ PLTs/ μ L), y la categoría de preparación (técnica de secuestro plaquetario gravitacional; separadores celulares estándar; filtración selectiva autóloga) (Alsosou and Harrison 2017).

Existen varias técnicas manuales, automáticas y semiautomáticas para la concentración de PLTs, siendo sus aplicaciones confusas porque cada método conduce a un producto diferente con una biología y unos contenidos distintos (Dohan Ehrenfest, Rasmusson et al. 2009). Mayoritariamente, los métodos para la obtención de PRP incluyen tres pasos secuenciales: primero, recolección de la sangre del paciente; segundo, separación de PRP y tercero, activación del PRP. Sin embargo, a pesar de que el PRP se ha utilizado ampliamente en medicina veterinaria, no se han publicado métodos de clasificación estandarizados válidos para productos derivados de PLTs en este campo.

Independientemente del producto PRP obtenido, éste debe contener una dosis clínica concentrada de PLTs que garantice efectos terapéuticos beneficiosos. No obstante, aunque podría ser lícito relacionar una mayor concentración de PLTs y, por tanto, una concentración local elevada de FC con un mayor éxito en el tratamiento clínico, autores como Giusti y colaboradores demostraron que una concentración muy elevada de PLTs en el PRP afectaron negativamente a la angiogénesis (Giusti, Rughetti et al. 2009). La concentración plaquetaria en las diferentes bioformulaciones de obtención de PRP no cumplen siempre el mismo rango. Según bibliografía contrastada, autores como Marx y colaboradores garantizaron efectos prometedores con una concentración de PLTs en el PRP de 1×10^6 PLTs/ μ L (Marx 2001), otros

estudios publicados expusieron concentraciones plaquetares de $1,3 \times 10^6/\mu\text{L}$ (Hee, Majd et al. 2003) y $1,5 \times 10^6/\mu\text{L}$ (Giusti, Rughetti et al. 2009). Se han publicado estudios de PRP con concentración de PLTs que va desde menos de 2 hasta 8,5 veces el valor basal, incluso algunos autores defienden una variación individual, donde cada individuo requiera una concentración diferente de PLTs para obtener un mismo beneficio clínico (Weibrich, Kleis et al. 2002, Marx 2004).

Cabe destacar que la correlación entre la concentración de PLTs y de FC no siempre es proporcional, ya que, por ejemplo, factores como el HGF o IGF se encuentran en la fracción plasmática y su potencial de reparación tisular no se verá afectada por el número de PLTs aplicadas con el PRP (Everts, Onishi et al. 2020).

Es probable que el efecto del PRP sobre la cicatrización sea consecuencia de distintas variables como la concentración plaquetar conseguida, el volumen administrado de PRP, tipo y extensión de la lesión a tratar y las propias condiciones del paciente, por lo que no existe una recomendación universal acerca del porcentaje de PLTs sobre el valor basal que debe abarcar el PRP para garantizar sus efectos óptimos (Weibrich, Kleis et al. 2002, Marx 2004).

Otros factores que pueden afectar a la composición del PRP obtenido son la fuerza y el tiempo de centrifugación, cambios en estos factores alterarán la concentración plaquetar, concentración en FC, pureza y viabilidad del PRP, así como el estado de activación de las PLTs (Everts, Onishi et al. 2020).

Métodos de obtención de PRP

Métodos de aféresis

Whitman y colaboradores y Marx y colaboradores fueron los primeros en utilizar un equipo de aféresis para separar el PRP del resto de componentes sanguíneo. La sangre obtenida del paciente se procesaba en un aparato de aféresis permitiendo una separación en tres componentes según diferentes densidades: PPP, capa leucocitaria (WBCs y parte de las PLTs) y RBCs. En un primer paso, la sangre del paciente (450 mL) se sometía a una primera centrifugación de 5.600 rpm, de este modo, los diferentes componentes sanguíneos se depositaban según densidad: los RBCs en la parte más baja, los WBCs en la parte intermedia y el PPP en la parte superior. A continuación, una vez eliminados los RBCs, se sometía a una segunda centrifugación de menor velocidad (2.400 rpm). De esta forma se obtenía el PRP en el que estaban concentrados los WBCs y las PLTs. La activación de las plaquetas se realizaba con la adición de

una mezcla de cloruro cálcico 10% y trombina bovina. El recuento plaquetario medio en el PRP obtenido era de 750.000 PLTs/ μ L aproximadamente (Whitman, Berry et al. 1997, Marx, Carlson et al. 1998).

Posteriormente, otros autores utilizaron esta misma técnica obteniendo mayor concentración plaquetar (1.250.000-1.500.000 PLTs/ μ L), siendo el contenido de WBCs muy bajo con respecto a la sangre basal (Zimmermann, Jakubietz et al. 2001, Weibrich, Kleis et al. 2005).

Doble centrifugación

Curasan PRP® Kit (Fa.Curasan, Kleinostheim, Germany)

En este método Curasan, la sangre se extrae directamente en tubos de 8,5 mL con citrato *Monovette (Sarstedt®)* que permiten extraer la sangre haciendo succión con un émbolo o usando el propio vacío del tubo. Este método emplea una centrifuga estándar de laboratorio y la sangre se centrifuga a 2.400 rpm durante 10 minutos. De este modo se obtiene una diferenciación de fracción plasmática, capa leucocitaria y RBCs. El plasma sobrenadante se transfiere a otro *Monovette* y se centrifuga de nuevo a 3.600 rpm durante 15 minutos obteniéndose un sedimento que contiene la concentración plaquetar. El plasma sobrenadante (PPP) se elimina del tubo dejando sólo 0,5 mL que se usarán para suspender el sedimento de plaquetas. Esta suspensión resultante es el PRP, que como resultado obtiene una concentración plaquetaria entre 1.000.000-2.500.000 PLTs/ μ L y una concentración leucocitaria entre 14.800 y 33.100 WBCs/ μ L (Weibrich, Kleis et al. 2002).

Método de Landesberg

Los autores Landesberg y colaboradores propusieron un protocolo de centrifugación doble con material básico de laboratorio. La sangre citratada (5 mL) se sometía a una primera centrifugación de 200 g durante 10 minutos, y posteriormente se recogía el plasma sobrenadante en un tubo sin anticoagulante que se sometía a otra centrifugación (200 g durante 10 minutos). En el fondo del tubo quedaba un sedimento plaquetario que se re-suspendía en un volumen determinado de plasma residual y constituía el PRP (Landesberg, Roy et al. 2000).

Sistemas semiautomáticos

Los sistemas semiautomáticos tienen como ventaja que permiten obtener un concentrado plaquetario de forma rápida, cómoda y con un riesgo menor de contaminación bacteriana (Vasconcelos, Figueiredo et al. 2003).

En el mercado se encuentran diversos sistemas semiautomáticos, se citan a continuación:

Arthrex ACP® System (Arthrex Bio Systems, Autologous Conditioned Plasma (ACP), Naples, FL, USA)

Este Sistema garantiza la obtención de un plasma autólogo rico en PLTs considerado como “plasma autólogo acondicionado” (ACP). Emplea para ello una centrifugación simple de 1.500 rpm durante 5 minutos. El ACP obtenido tiene una concentración de PLTs aproximada de 550.000 PLTs/ μ L sin contaminación de WBCs. Además, se obtienen concentraciones de PDGF-AB 25 veces superior a la sangre basal y 4 veces superior para TGF- β (<http://secure.cdn.arthrex.com>, 2012).

Gravitational Platelet Separation (GPS® System) (Biomet Merck Biomaterials, Darmstadt, Germany).

Este método emplea 54 mL de la sangre del paciente y 6 mL de anticoagulante (ACD-A), todo el volumen es traspasado a tubos GPS® y se centrifuga a 3.200 rpm durante 12 minutos. La concentración de PLTs que se obtiene es de 1.600.00 PLTs/ μ L con unos niveles de WBCs de 31.100 WBCs/ μ L, garantizando unos niveles de FC superiores a las presentes en el plasma sanguíneo (Marlovits, Mousavi et al. 2004).

Platelet Concentrate Collection System (PCCS® Kit) (3i-Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA):

Este sistema de doble centrifugación requiere de un volumen de sangre del paciente de 60 mL, recogidos en tubos con anticoagulante de tipo ACD-A9. La primera centrifugación a 3.800 rpm durante aproximadamente 3 minutos y la segunda durante 13 minutos a 3.000 rpm. Permite una concentración plaquetaria de 1.100.000 y 2.200.000 PLTs/ μ L, con unos niveles de WBCs que oscilan entre 5.500 y 14.800 WBCs/ μ L (Appel, Pötzsch et al. 2002, Weibrich, Kleis et al. 2002, Weibrich, Kleis et al. 2005).

Plateltex® (Plateltex, Bratislava, Slovakia).

Este método supone un sistema de doble centrifugado, donde la sangre del paciente recogida en tubos de 8 mL con anticoagulante ACD-A, se centrifugan por primera vez a 180 g durante 10 minutos, se aspira el plasma sobrenadante y se centrifuga por segunda vez a 1.000 g durante 10 minutos. Este sistema busca eliminar la cantidad suficiente de PPP para conseguir una concentración plaquetaria en torno a 1.600.000 PLTs/ μ L y una concentración de PDGF-AB de 60ng/mL (Mazzucco, Balbo et al. 2008).

Secquire PRP® System (PPAI Medical, Fort Myers, FL, USA):

Tras la centrifugación de la sangre anticoagulada con este sistema semiautomático, se obtienen tres capas diferenciadas: RBC, capa leucocitaria y plasma en la superficie. Con una jeringa se aspiran los RBCs del fondo del contenedor respetando la capa leucocitaria. Con otra jeringa colocada en el otro puerto de aspiración se recoge el plasma existente justo por encima de la capa leucocitaria (PRP) (<http://www.secquire.com/index4.htm>, 2013).

Smart PRP® System (Harvest Technologies Corporation, Munich, Germany):

Este sistema de doble centrifugación depende del hematocrito del paciente. Para la obtención de PRP se requieren de volúmenes de sangre alrededor de 50 mL. Obtiene un PRP con una concentración plaquetaria cercana a 1.250.000 PLTs/ μ L, una concentración leucocitaria de 19.261 WBCs/ μ L. La concentración de FC en el PRP obtenido es: PDGF-AB 208.3ng/mL, TGF- β 1 77.2ng/mL e IGF-I 91.4ng/mL (Weibrich, Kleis et al. 2003).

Otros sistemas disponibles comercialmente de obtención en el mercado son: *Fibrinet® Autologous Fibrin & Platelet System* (Cascade Medical Enterprises Ltd, Plymouth, UK) (Leitner, Gruber et al. 2006, Mazzucco, Balbo et al. 2009), *Regen PRP® Kit* (RegenLab, Mollens-VD, CH) (Mazzucco, Balbo et al. 2009) o, *Vivostat® PRF Kit* (Vivolution A/S, Birkerød, Denmark) (Leitner, Gruber et al. 2006).

PRGF®-Endoret®

Son muchos los kits comerciales disponibles actualmente para la obtención de PRP, lo que se traduce en una gran variabilidad en el contenido del producto (Magalon, Chateau et al. 2016). No sólo existe discrepancia en la concentración plaquetar, sino también en la inclusión de los WBCs en el PRP. Se considera que los L-PRP tienen enzimas leucocitarios que podrían contribuir a prevenir infecciones, sin embargo, se conoce que los WBCs inducen inflamación, alteran la matriz extracelular y dañan las células involucradas en la cicatrización de las heridas (Henriksen 2014). Aunque, por otro lado, la inclusión de WBCs en el PRP podría promover la biosíntesis de lipoxinas, relacionadas con la resolución de la inflamación al prevenir la activación de los NFS (Seta and Kuwana 2007, Lana, Macedo et al. 2019). Otro estudio expuso que el LR-PRP puede tener un impacto positivo sobre la liberación y actividad de los FC en comparación con PRP o PPP, defendiendo la inclusión de monocitos (MON) en las preparaciones de PRP por su capacidad inmunomoduladora y potencial de diferenciación, favoreciendo incluso la proliferación de células madre derivadas de la MO (Seta and Kuwana 2007, Perut, Filardo et al.

2013). Posteriormente, un estudio publicado por D'asta y colaboradores indicaron que falta evidencia para atribuir el efecto microbicida a los WBCs en el PRP (D'asta, Halstead et al. 2018).

El papel de los RBCs en el PRP está fuertemente contraindicado, ya que estas células eritroides cuando son administradas junto al PRP, producen la eriptosis o muerte de los RBCs, que provoca una respuesta local en los tejidos por la liberación de una potente citoquina (factor inhibidor de la migración de macrófagos) que inhabilita la migración de MON y macrófagos. Todo ello conduce a una situación proinflamatoria en los tejidos circundantes que inhibe la migración de células madre y la proliferación de fibroblastos y causa una disfunción celular local significativa (Repsold and Joubert 2018). Por lo tanto, es importante limitar la contaminación por RBCs en el PRP (Everts, Onishi et al. 2020).

Anitua y colaboradores dieron nombre al término Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), clasificándolo como un tipo de P-PRP, con una concentración moderada de PLTs (entre 1,5-3 veces las PLTs basales), en ausencia de WBCs y RBCs (Anitua, Sánchez et al. 2007, Anitua, Sánchez et al. 2009). Concentraciones diferentes de PLTs/ μ L tienen diferente eficacia en la inducción de la actividad de los fibroblastos. Una concentración de PLTs muy elevada proporciona un efecto contraproducente e inhibe los procesos de curación (Giusti, Rughetti et al. 2013). Autores como Anitua y colaboradores realizaron estudios donde demostraron que una concentración moderada de PLTs, aproximadamente de 1,5 a 2 veces el valor basal, proporciona mayores beneficios clínicos (Anitua, Sánchez et al. 2009, Anitua, Zalduendo et al. 2013).

PRGF® System, comercializado por BTI, proporciona una alternativa médica en diferentes campos clínicos dentro de la medicina regenerativa, siendo la primera técnica disponible del mercado. Cabe destacar que este sistema PRGF presenta como ventajas la obtención de un P-PRP biocompatible, versátil y seguro por ser puramente autólogo, facilita el control en su activación y utilización. Su obtención es a partir de un protocolo rápido, sencillo, manual y gravitacional con una sola centrifugación. Permite el control de la infección por sus propiedades bacteriostáticas y es aplicable en numerosos campos de la medicina por sus diferentes opciones de aplicación disponibles (gel, colirio, inyectable, coágulo, membrana o injertos) de forma segura y en ausencia de efectos secundarios, pudiendo adaptarlo según necesidades de tratamiento en diferentes patologías, así la presentación líquida puede ser útil como colirio o, terapia inyectable para infiltraciones en piel o tejidos del aparato locomotor; el coágulo se emplea con el fin de rellenar defectos y promover la regeneración tisular y tratar úlceras y; la malla de fibrina, por sus propiedades hemostáticas, resulta una buena terapia sellando defectos y estimulando la epitelización (Anitua, Sánchez et al. 2007).

El sistema de obtención PRGF®-Endoret® está patentado y su metodología está avalada por los certificados ISO 9001: 2008, ISO 13485: 2003 e ISO 13485:2003 CMDCAS, marcado estadounidense FDA (Food and Drug Administration) y la autorización de los ministerios de sanidad de Canadá y México (<http://bti-biotechnologyinstitute.com>,2014).

El protocolo para la obtención de PRGF®-Endoret® está ampliamente documentado en diferentes especies y se ha aplicado con éxito en diferentes áreas clínicas como medicina regenerativa (Anitua, Sánchez et al. 2006, Anitua, Sánchez et al. 2007, Solakoglu, Heydecke et al. 2020): curación de heridas, oftalmología, odontología, artrosis, tendinopatías o medicina estética en humanos (Anitua, Sanchez et al. 2012, Giacomello, Giacomello et al. 2015, Vaquerizo, Padilla et al. 2018, Anitua, Muruzábal et al. 2019, Navarro, Pino et al. 2020, Giacomello, Mortellaro et al. 2021, Rahhal-Ortuño, Fernández-Santodomingo et al. 2021, Soares and Prazeres Lopes 2021). En el área veterinaria este producto abarca estudios prometedores en especialidades como traumatología y oftalmología en perros (Damià Giménez, Carrillo Poveda et al. 2012, Vilar, Morales et al. 2013, Cuervo, Rubio et al. 2014) y caballos (Rushton, Kammergruber et al. 2018), cicatrización de heridas (Wang Saegusa 2017, Chicharro, Carrillo et al. 2018, Chicharro-Alcántara, Rubio-Zaragoza et al. 2018) o como tratamiento de defectos completos del cartílago en conejos (Torres-Torrillas, Damiá et al. 2021, Torres-Torrillas, Damiá et al. 2022). Sin embargo, se debe poner énfasis en la importancia de estandarizar un protocolo de obtención de PRP para cada especie animal, ya que están documentadas variaciones en la concentración de WBCs, RBCs, PLTs y, por tanto, de FC entre protocolos según especie por diferencias interespecíficas, como por ejemplo el tamaño plaquetar, la composición de los gránulos de las PLTs o el valor hematocrito, entre otros (Clemmons, Bliss et al. 1983, Dohan Ehrenfest, Rasmusson et al. 2009). Incluso, pueden surgir diferencias en la obtención de PRP entre individuos de la misma especie para un mismo protocolo descrito (Castillo, Pouliot et al. 2011, Carr, Canapp et al. 2015, Franklin, Garner et al. 2015, Chun, Canapp et al. 2020). Sin embargo, hoy en día no está estudiado este producto en la especie felina, siendo éste el objetivo principal de esta Tesis Doctoral.

Gatos

PRP en gatos

Los estudios acerca de la obtención de PRP en el gato son escasos y relativamente actuales. Silva y colaboradores fueron los primeros en diseñar un estudio acerca del PRP en esta especie cuyos objetivos fueron describir un método manual de obtención de concentrado plaquetar en gatos, describir la población celular de estos concentrados plaquetares y estudiar el impacto de la trombina bovina respecto al gluconato cálcico en diferentes tiempos sobre los FC PDGF-BB y TGF- β 1. El estudio se realizó en 16 gatos a los cuales se les extrajeron 2 tubos de 8 mL de sangre y cada uno de esos tubos fue centrifugado a 85 g durante 6 minutos. Posteriormente la fracción plasmática se dividió en un 50% como PC-A y PC-B para seguidamente llevar a cabo el conteo celular y de FC según protocolo de activación. Los autores afirmaron haber obtenido concentrados plaquetares clasificados como P-PRP, sin embargo, aunque consiguieron aumentar notablemente la concentración de PDGF-BB y TGF- β 1 y reducir la concentración de WBCs y RBCs

en las fracciones plasmáticas obtenidas con respecto a la sangre basal, quedaron muy lejos de las condiciones que debe cumplir un P-PRP (Silva, Alvarez et al. 2012).

En los últimos 5 años los estudios acerca del PRP en gatos han ido aumentando, aunque siguen siendo insuficientes. En 2020, Ferrari T. y Schwartz P. llevaron a cabo un estudio prospectivo que valoraba la obtención de PRP en 20 gatos empleando dos sistemas de centrifugación disponibles en el mercado evaluado previamente en perros. Los autores siguieron las recomendaciones del fabricante, aunque se modificó el volumen total de sangre extraído siendo menor que en los perros debido al menor tamaño corporal de los gatos, factor limitante para la extracción sanguínea en esta especie. Ninguno de los dos sistemas consiguió concentrar las PLTs en el rango óptimo descrito por el fabricante (2-5 veces las PLTs basales), sin embargo, ambos consiguieron resultados prometedores disminuyendo la concentración de RBCs y WBCs (Ferrari and Schwartz 2020).

Posteriormente, Chun y colaboradores diseñaron un estudio prospectivo donde participaron 11 gatos cuyo objetivo fue analizar un sistema de obtención de PRP disponible comercialmente para humanos. Como resultado, este sistema comercial de obtención de PRP empleado consiguió aumentar la concentración plaquetar en un 151% con respecto a la sangre basal disminuyendo notablemente la fracción eritrocitaria. Sin embargo, este derivado sanguíneo no pudo considerarse como un P-PRP por presentar concentraciones notables de WBCs (Chun, Canapp et al. 2020).

Dado el beneficio clínico del PRP en pacientes humanos, caballos y perros, cabe sospechar que esta terapia pueda ser igualmente eficaz en los gatos para determinadas patologías, relacionadas principalmente con medicina regenerativa. Aunque comparado con otras especies, los estudios de aplicación clínica de PRP en el gato es ínfima, cada vez son más los autores que ponen de manifiesto la necesidad de seguir investigando en este campo. El primer estudio que evaluó la aplicación clínica del PRP en gatos fue publicado en 2017 por el autor Gemignani y colaboradores. El estudio evalúa un caso clínico de un gato adulto con una herida traumática y contaminada, de dimensiones 23 x 46 mm ocasionada por la mordedura de un perro de dos días de evolución en la región del cuello al cual aplicaron tópicamente PRP heterólogo de perro. El paciente no tuvo efectos secundarios locales ni sistémicos permitiendo la formación temprana de tejido de granulación y posterior curación de la herida. Cabe señalar que el paciente recibió pauta antimicrobiana 5 días posteriores, sin embargo, no recibió terapia antiinflamatoria sistémica (Gemignani, Perazzi et al. 2017).

De manera más reciente, se ha publicado un estudio que evalúa la capacidad de la inyección subconjuntival de PRP autólogo en el tratamiento de úlceras corneales en 16 gatos y 12 perros, además de estimar la expresión de biomarcadores de estrés oxidativo en estos pacientes. El número de inyecciones se realizó de acuerdo con la respuesta de cada caso. Lo que observaron los autores fue que, en los gatos, el número de inyecciones subconjuntivales de PRP fueron superiores con respecto a los perros, afirmando que la administración de PRP autólogo es un tratamiento eficaz y seguro en el manejo de úlceras corneales en ambas especies (Farghali, AbdElKader et al. 2021). Sin embargo, es importante puntualizar que se aplicó el mismo protocolo de obtención de PRP en perros que en gatos, previamente descrito por Kececi y colaboradores en humana y, además, en este estudio tampoco se evaluó analíticamente el subproducto obtenido antes de su aplicación (Kececi, Ozsu et al. 2014).

Un estudio de 2022, publicado por el autor Farid y colaboradores, estudió la eficacia del PRP como tratamiento en la esclerosis múltiple en 15 gatos. Los animales fueron divididos en 3 grupos de 5 animales: grupo control (no se indujo daño), grupo control positivo al que se produjo la lesión de esclerosis mediante inyección de bromuro de etidio (BE) y posteriormente se administró una inyección intratecal de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y un tercer grupo al que se le provocó también la lesión de la misma forma, pero tratado con PRP inyectado intratecalmente 14 días después de provocar la lesión. La recuperación motora de los pacientes fue evaluada los días 1, 3, 7, 14, 20 y 28 post administración del tratamiento. Posteriormente los pacientes fueron eutanasiados y valorada la respuesta al tratamiento mediante técnicas como resonancia magnética e histopatología. Como resultado del estudio se obtuvo una mejora en la función motora, así como cambios histológicos y en la resonancia magnética en el grupo tratado con PRP (Farid, Abouelela et al. 2022). No obstante, cabe destacar que los autores del estudio extrapolaron un protocolo de obtención de PRP equino descrito por Giraldo C. y colaboradores en 2015 (Giraldo, Álvarez et al. 2015) sin comprobar que la fracción obtenida en los gatos tuviera una concentración de PLTs óptima para considerar el hemoderivado como PRP.

Un estudio publicado por Angelou y colaboradores registró la eficacia de la aplicación intralesional de PRP, descrito previamente por Dionyssiou y colaboradores en 2013 (Dionyssiou, Demiri et al. 2013), en heridas abiertas producidas experimentalmente en 8 gatos. La cicatrización de las heridas se evaluó mediante examen clínico, planimetría, láser Doppler e histología en los días 0, 7, 14 y 25 post-lesión además de valorar las metaloproteinasas. Los autores obtuvieron una diferencia significativa en la cobertura total del fondo de la herida con tejido de granulación entre los grupos PRP y control. Esto puede deberse al efecto favorecedor

de la angiogénesis y al aumento de fibroblastos por parte de los FC, por lo que dicho estudio demostró que la administración intralesional de PRP mejora la contracción, la cicatrización total de heridas y la perfusión tisular en déficits cutáneos con el tejido subcutáneo eliminado en gatos. Para la preparación del PRP en esta publicación, los autores emplearon un kit comercial disponible para humanos que no había sido evaluado previamente en gatos. Obtuvieron en el 50% de los gatos, un aumento de PLTs de, al menos, 2 veces en comparación con la sangre basal con una reducción notable de RBCs y WBCs, no obstante, aplicaron el plasma a todos los gatos del estudio (Angelou, Psalla et al. 2022).

Plaquetas en gatos

Las PLTs de los gatos son propensas a activarse y, como consecuencia, a aglutinarse después de la recolección o manejo de la sangre. A este fenómeno se le atribuye el término de pseudotrombocitopenia y dificulta la determinación de los recuentos precisos de PLTs en esta especie (Moritz and Hoffmann 1997). Otra particularidad de las PLTs en los gatos que dificulta el conteo electrónico es su gran tamaño y variabilidad de este en comparación con otras especies, lo que obstaculiza separarlas de los RBCs en función del volumen celular. En la mayoría de los animales domésticos y en humanos la población de las PLTs sigue una distribución uniforme en cuanto al tamaño (2 – 4 mm), sin embargo, en el gato el tamaño plaquetar puede variar de 2 a 6 mm (Weiser and Kociba 1984, Boudreaux and Ebbe 1998, Boudreaux, Osborne et al. 2010). En otras especies, como por ejemplo el perro y el humano, existen mutaciones en el gen β 1-tubulina que dan lugar a PLTs de mayor tamaño y, para mantener una hemostasia adecuada, tiene lugar una trombocitopenia fisiológica. Por el contrario, en el gato no se ha visto esta relación entre la presencia de macroplaquetas y trombocitopenia. Una diferencia interesante en gatos en comparación con perros y humanos con mutaciones en el gen β 1-tubulina es que, las mutaciones en este gen están ubicados en zonas diferentes en perros y humanos comparado con los gatos, estos cambios podrían resultar en un tamaño alterado de las PLTs sin tener un efecto sobre el número de estas en gatos, aun así se requiere de estudios adicionales para determinar qué diferencias en aminoácidos desempeñan un papel en el tamaño y forma de las PLTs en gatos (Boudreaux, Osborne et al. 2010).

A su vez, la presencia de agregados plaquetares da lugar a un conteo electrónico de WBCs erróneo (Knoll and Rowell 1996). Por ello, es importante evaluar mediante un frotis sanguíneo el conteo de PLTs y presencia de agregados plaquetares en estos pacientes (Harvey 2017). La trombocitopenia real en gatos se ha documentado en porcentajes muy bajos (1,2% y 3,1%)

(Jordan, Grindem et al. 1993, Norman, Barron et al. 2001). A parte del gran tamaño plaquetar en esta especie, se conoce que las PLTs de los gatos presentan concentraciones de serotonina superiores en comparación a otras especies. La serotonina está fuertemente relacionada con la activación plaquetaria, una vez se expone esta hormona, la agregación plaquetaria es irreversible. La adherencia de las PLTs depende también de fuentes de energía intra y extracelulares, siendo las reservas intracelulares de glucógeno y glucosa las principales fuentes de energía para la producción de ATP en las PLTs. Se ha demostrado que las PLTs son capaces de absorber la glucosa de la circulación a través de transportadores de membrana de glucosa, pudiendo ser la concentración de glucosa en la sangre un motivo de formación de agregados plaquetarios, ya que su concentración va disminuyendo en la muestra sanguínea una vez recolectada (Riond, Waßmuth et al. 2015). Se ha postulado que la calidad de la recolección de sangre es la principal causa de la presencia de agregados plaquetarios en muestras de sangre felina (Moritz and Hoffmann 1997, Norman, Barron et al. 2001). Sin embargo, no hay información disponible en gatos sobre la cinética de la formación de agregados plaquetarios en la sangre con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), anticoagulante altamente empleado para la recolección de sangre para su posterior análisis, y el curso de los recuentos plaquetarios durante un período de tiempo clínicamente relevante. En 2015, Riond B. y colaboradores diseñaron un estudio cuyo objetivo fue determinar el recuento de PLTs en gatos sanos durante un período de tiempo de 24 horas (h) después de la recolección de sangre con EDTA en 9 puntos temporales, así como evaluar la calidad de la extracción sanguínea, el efecto de la anestesia o el efecto de las concentraciones de glucosa en la formación de agregados plaquetarios. Se analizaron muestras de 30 gatos sanos, evaluadas mediante citometría de flujo basada en fluorescencia e impedancia y mediante evaluación de frotis sanguíneo. Empleando la citometría de flujo, el 47% de las muestras analizadas fueron trombocitopénicas de uno a 8 puntos temporales después de la recolección frente a un 57% de las muestras evaluadas mediante frotis sanguíneo. A las 24 h, todas las muestras trombocitopénicas mostraron recuentos plaquetarios normales. Las diferencias significativas en los recuentos de PLTs entre método automático y manual, se asociaron con la presencia y el tamaño de los agregados y el tiempo transcurrido desde la extracción. Los niveles de glucosa en sangre periférica mostraron niveles decrecientes con el tiempo y una influencia significativa en los agregados plaquetarios con la concentración de glucosa. No se observó una influencia estadísticamente significativa de la anestesia en los recuentos de PLTs, ni se obtuvieron diferencias significativas con la calidad de la extracción de la sangre, ya que una recolección perfecta de sangre no impidió la agregación plaquetaria en los gatos del estudio (Riond, Waßmuth et al. 2015). Hasta el presente estudio, se recomendaba

determinar los recuentos de PLT dentro de un período de tiempo relativamente corto después de la recolección de sangre, desde 30 minutos (Moritz and Hoffmann 1997) hasta 4 - 6 h (Knoll and Rowell 1996). Riond y colaboradores ya obtuvieron agregados plaquetares en los tiempos recomendados por anteriores autores, no obstante, se debería reflexionar acerca de analizar las muestras a las 24 h de la recolección, donde los agregados plaquetares habían desaparecido (Riond, Waßmuth et al. 2015).

Virus de la leucemia felina (FeLV)

La leucemia viral felina es causada por FeLV, uno de los retrovirus con mayor impacto global en la salud de los gatos domésticos a nivel mundial. Se describió por primera vez en 1964 por Jarrett y colaboradores al encontrar el virus replicado en la membrana de los linfoblastos en un gato con linfoma (JARRETT, MARTIN et al. 1964). Este virus provoca una disminución en el sistema inmunitario de los gatos afectados pudiendo dar lugar a enfermedades inmunomediadas, neoplasias y alteraciones hematológicas.

Epidemiología y transmisión

FeLV es un γ -retrovirus formado por una cadena simple de ARN. Este virus integra su genoma como una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células del gato infectado gracias a la enzima de la transcriptasa inversa, considerándose en este momento provirus. El virus presenta una envoltura lípido soluble, lo que convierte a este virus en débil y vulnerable en el ambiente inactivándose de forma fácil, además, el virus presenta una cápsula proteica con un peso molecular de 27 kilodaltons (kDa) reconocida con el nombre de p27. El contagio entre gatos requiere un contacto estrecho y generalmente ocurre con mayor prevalencia entre individuos con una relación amistosa, cuya principal vía de contagio es la oronasal, siendo la saliva el vehículo principal en la transmisión del virus. Los gatitos son especialmente vulnerables al contagio de la enfermedad, aunque se ha demostrado que los gatos adultos se ven también altamente afectados (Levy, Scott et al. 2006, Hartmann 2012). La transmisión puede ocurrir también por transmisión vertical de madres infectadas a los fetos o sus crías o, de forma yatrogénica por agujas contaminadas o transfusión de sangre de gatos infectados. El virus se replica en muchos tejidos como glándulas salivales, MO y epitelio respiratorio. Si tras la infección, el sistema inmune del gato infectado no interviene, el FeLV se propaga a la MO infectando a las células precursoras de la hematopoyesis.

Patogenia

Se han descrito 3 subtipos principales de FeLV: FeLV-A, FeLV-B y FeLV-C y, más recientemente se han aislado otros 2 subtipos más de FeLV: FeLV-D y FeLV-T. Los subgrupos de FeLV están estrechamente relacionados desde el punto de vista inmunológico, pero utilizan diferentes receptores celulares (Miyazawa and Jarrett 1997, Chiu, Hoover et al. 2018). El principal determinante patógeno de FeLV es la composición proteica de la envoltura de los subgrupos virales, sin embargo, los mecanismos por los cuales la diferencia en esta secuencia proteica influye en la patogenia no se conoce con exactitud (Moser, Burns et al. 1998).

La infección por FeLV se clasifica en diferentes grupos según la patogenia (Hartmann and Hofmann-Lehmann 2020) :

- **Infección progresiva:** el sistema inmunitario del gato infectado no es capaz de controlar la infección, provocando una replicación extensa del virus, primero en tejido linfoide y, posteriormente, en MO, tejidos glandulares y mucosas. Estos gatos no son capaces de controlar la viremia y diseminarán el virus de por vida.
- **Infección regresiva:** aproximadamente un tercio de los gatos infectados con FeLV son capaces de controlar la viremia, antes o poco después de que el virus se integre en la MO, gracias a un sistema inmunitario eficaz. Estos gatos no llegarán a desarrollar viremia, aunque el provirus de FeLV se integrará en el genoma de estos gatos permaneciendo infectados de por vida y serán portadores del provirus FeLV. A pesar de que no eliminarán el virus a través de la saliva, el ADN del provirus puede transmitirse a otros gatos a través de transfusiones sanguíneas. Los gatos con infección regresiva pueden volverse virémicos en situaciones de inmunosupresión por reactivación del virus, ya que el provirus integrado conserva su capacidad de replicación durante toda la vida del gato, siendo posible la reactivación incluso muchos años después de la exposición inicial a FeLV.
- **Infección abortiva:** los gatos con este tipo de infección nunca desarrollarán viremia, ya que el virus se controla en el tejido linfoide sin llegar a la MO debido a una respuesta inmunitaria humoral eficiente. Se ha descrito este tipo de infección aproximadamente en un tercio de la población de gatos infectados con FeLV.
- **Infección atípica focal:** hasta un 10% de los gatos infectados con FeLV se produce una replicación del virus local atípica de forma persistente. Los tejidos afectados en este tipo de infección son las glándulas mamarias, vejiga, ojos, bazo, intestino delgado o ganglios linfáticos.

Prevalencia

La prevalencia es muy variable dependiendo de la ubicación geográfica y la población animal ensayada, variando entre 3,0% a 28,4% en América del Sur, 0,5% a 24,5% en Asia y Australia/Nueva Zelanda, 2,3% a 3,3% en los Estados Unidos (EEUU) y 0,7 a 15,6% en Europa, entre otros (Gleich and Hartmann 2009, Little, Sears et al. 2009, Hellard, Fouchet et al. 2011, Englert, Lutz et al. 2012, Spada, Proverbio et al. 2012, Hofmann-Lehmann, Gönczi et al. 2018, Westman, Norris et al. 2019). En España, concretamente, la prevalencia reportada de FeLV es del 2,6% (Studer, Lutz et al. 2019).

Signos clínicos

La replicación activa del virus en los diferentes tejidos es la responsable de los signos clínicos en los gatos con infección progresiva, aunque también se ha descrito en gatos con infección regresiva por reactivación del virus. Los gatos con FeLV a menudo desarrollan alteraciones relacionadas con afectación de la MO como anemia y otras citopenias (Little, Levy et al. 2020), así como enfermedades inmunomediadas como anemia hemolítica inmunomediada, glomerulonefritis y poliartritis. Otro hallazgo frecuente en gatos con FeLV es el desarrollo de linfoma (Louwerens, London et al. 2005). La mayoría de los gatos (aproximadamente el 80%) con infección progresiva tienen una esperanza de vida entre 4 y 5 años. Sin embargo, la progresión de la enfermedad dependerá del sistema inmune, así como el factor limitante estrés o la presencia de enfermedades concurrentes en el propio individuo (Hartmann 2012, Hofmann-Lehmann and Hartmann 2020).

Diagnóstico

Según la Asociación Americana de Clínicos Felinos (American Association of Feline Practitioners, AAFP) lo más importante para el control de las enfermedades en gatos causadas por retrovirus es la detección de estos mediante pruebas diagnósticas. Se recomienda realizar estos tests como pruebas screening en el momento de adquirir un gato como mascota, antes del momento de la vacunación frente a retrovirus, a lo largo de la vida del gato cuando éste está altamente expuesto a la infección de estos virus o, siempre que el paciente muestre signos clínicos compatibles de enfermedades asociadas a retrovirus.

El diagnóstico de FeLV se basa principalmente en la detección del antígeno p27. Son varias las pruebas que se encuentran disponibles para la detección de FeLV, sin embargo, el diagnóstico de la enfermedad dependerá del tipo de infección que se presente en cada gato. El método

diagnóstico más empleado en la clínica rutinaria es la prueba ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* “ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas”), realizada con sangre entera, suero o plasma, permitiendo la detección de la enfermedad en el primer mes de la infección. Al ser una prueba que detecta antígeno p27, los anticuerpos maternos no interfieren en el resultado, siendo una prueba útil en gatitos. En caso de un resultado negativo en una prueba ELISA, se recomienda repetir el procedimiento al menos un mes después. Otra prueba disponible que detecta p27 es la fluorescencia directa, que puede realizarse en sangre o MO. Esta prueba requiere un período de 6 a 8 semanas post-infección para la detección del virus, por lo que no son consideradas buenas pruebas de screening. Las pruebas de reacción en cadena a la polimerasa (PCR), realizada a partir de sangre, MO, diferentes tejidos o, saliva de gatos infectados, es capaz de detectar ácido nucleico viral, por lo que es la prueba de elección en gatos con infección regresiva o cuando otras pruebas de detección de p27 tienen resultados discordantes (Hartmann and Hofmann-Lehmann 2020).

Manejo y tratamiento de la enfermedad

En todos los casos, se debe mantener a los gatos infectados de FeLV aislados de gatos negativos a leucemia. En caso de gatos FeLV sin desarrollo de la enfermedad, se recomienda revisiones generales que incluyan hematología, perfil bioquímico completo y uroanálisis de forma periódica (cada 6-12 meses). Se recomienda, además, esterilizar a los gatos tanto machos como hembras, con el fin de minimizar la transmisión. Por último en el manejo de minimizar el contagio del virus, se recomienda el uso de soluciones desinfectantes en las áreas de hospitalización o simples precauciones de limpieza entre gatos, ya que el virus es muy sensible y se inactiva rápidamente fuera del huésped (Lutz, Addie et al. 2009).

No existe un tratamiento específico para FeLV. La terapia en los gatos infectados se centra en administrar tratamiento de soporte en caso de signos clínicos asociados o enfermedades concomitantes, así como llevar a cabo un protocolo vacunal adecuado en los gatos negativos minimizando la probabilidad de contagio. Los estudios acerca de la terapia con inmunomoduladores y antivirales en gatos FeLV son limitados. Sin embargo, el antiviral 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) ha demostrado inhibir la replicación de FeLV *in vitro* e *in vivo* en infecciones experimentales, reduciendo la carga viral plasmática mejorando el sistema inmune y estado clínico del paciente, aumentando la calidad de vida y prolongando la esperanza de vida en los pacientes infectados (Lutz, Addie et al. 2009).

Virus de la inmunodeficiencia felina (FIV)

La inmunodeficiencia felina es una enfermedad provocada por FIV. Este retrovirus, junto a FeLV, presenta un alto impacto en la salud de los gatos domésticos de todo el mundo. Se caracteriza por provocar la disminución de la función del sistema inmunitario del gato infectado afectando su calidad de vida y tasa de supervivencia (Westman, Coggins et al. 2022).

Epidemiología y transmisión

FIV es un retrovirus del género lentivirus. Se han aislado cinco subtipos de FIV: A, B, C, D, y E según diferencias en la secuencia de nucleótidos. Los subtipos A y B son los más distribuidos a nivel mundial, mientras que el subtipo E es el menos distribuido. Los gatos pueden infectarse de forma simultánea con más de un subtipo y en un país pueden coexistir diferentes subtipos de FIV (Hofmann-Lehmann, Holznagel et al. 1997). Algunos autores defienden la necesidad de ampliar nuevas investigaciones acerca de subtipos probables, aunque todavía desconocidos para FIV, pudiendo tener repercusión clínica en el desarrollo del cuadro clínico en los pacientes infectados (Hayward and Rodrigo 2010).

El principal modo de transmisión de este retrovirus es a través de heridas por mordedura (Hosie, Addie et al. 2009), siendo los machos no castrados los principales afectados (Levy, Scott et al. 2006, Westman, Paul et al. 2016). Se ha documentado también la transmisión vertical, donde hasta el 70% de los gatitos pueden verse infectados si la madre se encuentra gravemente afectada por FIV durante la gestación o la lactancia. La transmisión yatrogénica también ha sido descrita por asepsia inadecuada en la esterilización de material quirúrgico o transfusiones sanguíneas. El virus es muy vulnerable en el ambiente, sobreviviendo pocos minutos fuera del huésped y se inactiva de manera sencilla con desinfectantes comunes e incluso con jabón común (Hosie, Addie et al. 2009).

Patogenia

El FIV provoca una alteración progresiva de la función inmunitaria del gato infectado. El virus tiene un tropismo primario por los linfocitos, incluyendo linfocitos B, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y monocitos/macrófagos (Hosie, Addie et al. 2009). Tras la infección por FIV, el virus puede aislarse en los linfocitos a los 10-14 días, alcanzando un nivel de viremia máxima entre las 7 y 8 semanas post infección. A continuación, la carga vírica irá disminuyendo gradualmente hasta que vuelva a aumentar de forma notable en las fases terminales de la enfermedad o fase de inmunodeficiencia. En el momento de máxima replicación del virus, el número de linfocitos

CD4+ disminuye. Seguido a esta linfopenia inicial aparece un aumento en la producción de anticuerpos frente a FIV, lo que se traduce en un aumento de linfocitos CD8+ y por consiguiente una inversión del cociente CD4+/CD8+ de forma persistente. Con el tiempo, el efecto citopático del FIV provoca una pérdida progresiva de linfocitos CD4+ y CD8+ (Joshi, Vahlenkamp et al. 2004, Murphy, Vapniarsky et al. 2012). Después de un largo período de latencia clínica, la pérdida progresiva de linfocitos T da lugar a un síndrome de inmunodeficiencia caracterizado por infecciones secundarias crónicas y recurrentes (Hartmann 2011, Carlton, Norris et al. 2022).

Además de la linfopenia, se han observado otras alteraciones como neutropenia, eosinopenia, leucopenia (Hofmann-Lehmann, Holzmagel et al. 1995, Callanan, Jones et al. 1996), anemia, trombocitopenia y pancitopenia (Fujino, Horiuchi et al. 2009, Gleich and Hartmann 2009). Estas citopenias ocurren en respuesta a la infección de las células progenitoras mieloides e inhibición de la hematopoyesis (Beebe, Gluckstern et al. 1992, Fujino, Horiuchi et al. 2009). La infección por FIV a largo plazo también puede conducir al desarrollo de neoplasias malignas hematopoyéticas (Kaye, Wang et al. 2016).

Hay tres fases de la infección por FIV (Little, Levy et al. 2020):

- **Fase aguda:** los gatos son virémicos y sintomáticos, esta fase tiene una duración de 1 a 3 meses tras la infección. En esta fase tiene lugar una disminución notable de los linfocitos T CD4+.
- **Fase asintomática o latente:** en esta fase tiene lugar una producción elevada de anticuerpos frente a FIV, la carga viral circulante en los pacientes disminuye notablemente. La ratio CD4+ / CD8+ se invierte por el aumento de los linfocitos CD8+ frente a la caída de linfocitos CD4+. Esta fase puede durar muchos años.
- **Fase progresiva o crónica:** generalmente el progreso de la infección por FIV provoca una disminución progresiva de los linfocitos CD4+ y CD8+ que conlleva a un debilitamiento del sistema inmunitario del gato infectado. En esta fase de inmunodeficiencia los gatos están predispuestos a múltiples infecciones de forma crónica y recurrente.

Prevalencia

La tasa de prevalencia mundial de FIV varía de 2 a 44% (Pedersen, Ho et al. 1987, Hartmann 1998), registrando del 3 al 18% en los EEUU (Levy, Scott et al. 2006), del 6 a 44% en Asia (Ishida, Washizu et al. 1989, Sprißler, Jongwattanapisan et al. 2021), 13 a 20% en Australia (Westman, Paul et al. 2016, Carlton, Norris et al. 2022), hasta un 30% en Europa (Carlton, Norris et al. 2022,

Priolo, Masucci et al. 2022), oscilando en España entre el 1 y el 20,9% (Ayllón, Diniz et al. 2012, Miró, Rupérez et al. 2014, Montoya, García et al. 2018, Alcover, Basurco et al. 2021, Candela, Fanelli et al. 2022, Villanueva-Saz, Giner et al. 2022).

Signos clínicos

Los gatos infectados permanecerán durante múltiples años asintomáticos, incluso algunos de ellos pueden no llegar a desarrollar la enfermedad a lo largo de su vida. No obstante, en la fase clínica, los signos clínicos son consecuencia de la inmunosupresión e infecciones secundarias, siendo habitual manifestaciones como pérdida de peso, gingivoestomatitis crónica, rinitis crónica, linfadenopatía, glomerulonefritis inmunomediada y neoplasias como linfoma de células tipo B.

El tiempo de supervivencia en gatos infectados con FIV es muy variable, dependiendo de factores como el subtipo de FIV, el genoma del paciente, el impacto de las co-infecciones o el estrés (Hartmann 2012).

Diagnóstico

El diagnóstico de FIV, en general, se lleva a cabo mediante la detección de anticuerpos empleando test ELISA y suele ser suficiente para el diagnóstico puesto que FIV produce una infección persistente. La detección de anticuerpos frente a FIV es detectable desde los primeros 60 días post infección, aunque en algunos casos puede ocurrir de manera más tardía. Debido a que la carga viral circulante de FIV no es alta, la detección de antígeno no es muy recomendable.

En caso de sospechar de un falso positivo en la prueba ELISA las recomendaciones son repetir de nuevo la prueba al menos 60 días más tarde o realizar otras pruebas como Western Blot o inmunofluorescencia indirecta (IFI) o PCR, aunque esta última puede dar falsos negativos por la gran cantidad de subtipos de FIV que hay y la baja carga viral del virus (Little, Levy et al. 2020).

Manejo y tratamiento de la enfermedad

No existe un tratamiento específico frente a FIV. El manejo de la enfermedad va encaminado al control de los signos clínicos asociados a coinfecciones y desarrollo de otras enfermedades como neoplasias. La esperanza de vida en gatos FIV positivos es muy variable, siendo menor en los casos con coinfecciones de FeLV o, en casas donde conviven varios gatos con individuos infectados. No obstante, se ha demostrado que los gatos infectados con FIV pueden tener

períodos de longevidad altos cuando reciben revisiones de forma periódica en el veterinario y se administra terapia para las enfermedades concurrentes (Little, Levy et al. 2020).

Material y Métodos

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Materiales

Esta Tesis Doctoral está basada en la investigación sobre la optimización del PRGF®-Endoret® en gatos y su relación con enfermedades víricas felinas: leucemia e inmunodeficiencia. Se ha dividido el trabajo en 3 estudios diferentes basados en los 3 objetivos principales del estudio.

Todos los propietarios de los animales incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado por escrito tras haber sido notificados de toda la información relevante del proyecto.

El estudio clínico fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera (2018/VSC/PEA/0196), y por las autoridades autonómicas competentes siguiendo las normas referentes a bienestar y animal (RD53/2013 sobre protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos -Boletín Oficial del Estado del 8 de febrero – que adecúa la Directiva Comunitaria 2010/63/UE).

Modelo animal

La presente Tesis Doctoral se realizó con pacientes clínicos del Hospital Clínico Veterinario UCH-CEU de la especie felina (*Felis silvestris catus*) de diversas razas y edades, tanto machos como hembras. Se incluyeron un total de 57 animales en este trabajo. La inclusión en diferentes grupos: gatos sanos, gatos FeLV y gatos FIV, se detalla posteriormente según los diferentes estudios clínicos.

Criterios de inclusión

Previo a la inclusión de los pacientes de esta Tesis Doctoral según grupo de estudio, se realizó una evaluación para comprobar su estado de salud. Este estudio incluyó un examen físico completo (exploración física general y valoración de constantes vitales) y una analítica sanguínea que incluía hemograma, bioquímica básica y un test serológico de IDEXX SNAP® test FeLV/FIV (tabla 1). Se consideran animales **sanos** aquellos que no presentaban alteraciones analíticas hematológicas ni bioquímicas y presentaban un resultado negativo en la prueba SNAP® de IDEXX (Figura 1A). Los gatos **FeLV**, debían presentar un resultado positivo solo frente al antígeno de FeLV (Figura 1B) sin alteraciones analíticas hematológicas ni bioquímicas. Por último, los gatos considerados **FIV**, debían mostrar un resultado positivo en la prueba SNAP® de IDEXX frente a anticuerpos anti-FIV (Figura 1C) y, a su vez, parámetros hematológicos y bioquímicos dentro del rango de referencia.

Criterios de exclusión

Las muestras de plasma que tras su centrifugación mostraron alteraciones como coágulos de fibrina (Figura 2), hemolizadas, o en caso de muestra insuficiente, fueron descartadas del estudio.

A continuación, la siguiente tabla muestra los parámetros analíticos que fueron registrados en cada paciente previa inclusión en el estudio (tabla 1).

Tabla 1: Parámetros analíticos medidos en cada paciente para evaluar su estado de salud.

Hematología	Bioquímica	Serología
Eritrocitos (M/ μ L)	Creatinina (mg/dL)	Virus Leucemia felina
Hemoglobina (g/dL)	Urea (mg/dL)	Virus Inmunodeficiencia felina
Hematocrito (%)	Colesterol (mg/dL)	
MCV (fl)	GGT (UI/L)	
MCH (pg)	ALT (UI/L)	
MCHC (g/dL)	ALP (UI/L)	
CH (pg)	Glucosa (mg/L)	
HDW (g/dL)	Proteínas Totales (g/dL)	
RDW (%)	Albúmina (mg/dL)	
RET ($10^3/\mu$ L)	Globulinas (g/dL)	
Leucocitos (K/ μ L)	Ratio Alb/glob (g/mL)	
Linfocitos (K/ μ L)	Na+ (mEq/L)	
Neutrófilos (K/ μ L)	K+ (mEq/L)	
Monocitos (K/ μ L)	Cl- (mEq/L)	
Eosinófilos (K/ μ L)		
Basófilos (K/ μ L)		
Plaquetas (K/ μ L)		
VPM (fl)		

MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media; GGT: gama glutamil transpeptidasa; ALT: alanino aminotransferasa; ALP: fosfatasa alcalina.

Figura 1. Interpretación prueba SNAP® IDEXX FeLV/FIV

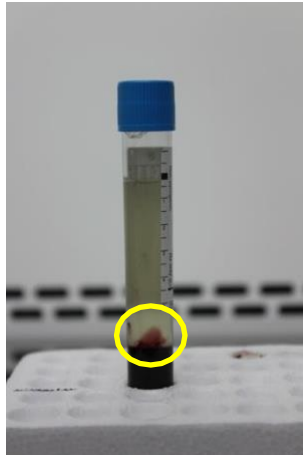


A. Resultado negativo para FeLV y FIV (gato sano).

B. Resultado positivo a FeLV (gato FeLV+).

C. Resultado positivo a FIV (gato FIV+).

Figura 2. Formación de coágulo de fibrina tras la centrifugación de la muestra. Muestra no válida.



Equipos

- Máquina de bioquímica sanguínea (Olympus AU600 Automatic Chemistry Analyzer®, Olympus Europe GmbH, Hamburg, Germany).
- Contador hematológico (Advia 2121i Siemens®, Siemens Healthineers España, Madrid, España).
- Centrífuga para PRGF (PRGF® System VI, Biotechnology Institute®, Álava, España) (**Figura 3A**).
- Kit comercial ELISA para TGF- β 1 (Human TGF-beta1 DuoSet ELISA de R&D Systems DY240-05).
- Kit comercial ELISA para PDGF-BB (Human PDGF-BB DuoSet ELISA de R&D Systems DY220).
- Bomba de infusión BRAUN Infusomat® fms (B-Braun Surgical SA, Rubí, Barcelona, España).
- Tensiómetro electrónico automático SunTech® Medical Vet 20.

Material fungible

- Jeringuillas de 1 y 2 mL (Jeringas hipodérmicas Injekt®, B-Braun, Melsulgen, Alemania).
- Agujas hipodérmicas de 22G (Sterican®, B-Braun, Mesulgen, Alemania).
- Tubos EDTA de 0,5 mL (AQUISEL® K3E/EDTA 3K, AQUISEL, Barcelona, España).
- Tubos Heparina sódica 1 mL (AQUISEL® LH/Li HEPARIN, AQUISEL, Barcelona, España).

- Tubos eppendorf de 1,5 mL (Eppendorf®, Alvet Plus, S.L., Valencia, España).
- Catéter periférico de 22G (Vasovet®, B-Braun, Mesulgen, Alemania).
- Equipo de infusión (Infusomat® Space ENFit®, B-Braun, Mesulgen, Alemania).
- Prueba de detección de antígeno frente a FeLV (p27) y detección de anticuerpos frente a FIV (SNAP® IDEXX FeLV/FIV)
- Kit recolección de sangre PRGF®-Endoret® (BTI Biotechnology Institute, Álava, España) (Figura 3B):
 - Sistema Vacutainer de extracción 22G.
 - Tubos Vacutainer de 9 mL de citrato sódico 3,8%.
 - Solución para activado del PRGF® (Cloruro cálcico 10%).
 - Tubos sin aditivo para recolección de las fracciones plasmáticas.

Soluciones y fármacos

- Solución Ringer Lactato Braun® (B-Braun, Barcelona, España).
- Dexmedetomidina (Dexdomitor®, Esteve, España).
- Butorfanol (Butomidor®, Richter Pharma, Wels, Austria).
- Alfaxalona (Alfaxan®, Jurox, Dublin, Irlanda).

Figura 3. Equipo para preparación PRGF®-Endoret®



A. centrifuga para PRGF (PRGF® System VI, Biotechnology Institute®, Álava, España).



B. Kit recolección de sangre PRGF®-Endoret® (BTI Biotechnology Institute®, Álava, España).

Métodos

Para la obtención de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, se han realizado 3 estudios diferentes. En una primera fase, llevada a cabo en pacientes sanos, se ha buscado la obtención de un hemoderivado que cumpliera con los criterios PRGF®-Endoret®. Para ello, el primer estudio de la Tesis Doctoral tiene como objetivo estandarizar el protocolo de obtención de PRP en gatos según las condiciones PRGF®-Endoret®. Estas condiciones se centran en una concentración moderada de PLTs, libre de WBCs y RBCs. Para ello, se valoraron diferentes protocolos modificando las g en la centrifugación.

En una segunda fase y una vez establecido el mejor protocolo, se desarrollaron dos estudios, uno en gatos infectados con FeLV y otro en gatos infectados con FIV, con el objetivo de evaluar la respuesta de los pacientes enfermos a este protocolo y como afecta cada una de estas enfermedades a la obtención de los factores de crecimiento PDGF-BB y TGF- β 1.

Recolección de sangre

Para asegurar el correcto muestreo y minimizar el estrés de los pacientes, la extracción de sangre se realizó bajo sedación utilizando una combinación IM de butorfanol (0,3 mg/kg), dexmedetomidina (12 µg/kg) y alfaxalona (0,8 mg/kg). Después de la sedación, la vena cefálica fue cateterizada con un catéter de 22G para recoger 0,5 mL de sangre que fueron trasladados inmediatamente a un tubo de 0,5 mL que contenía K3-EDTA para el conteo sanguíneo como muestra basal.

Consecutivamente, se recogieron un total de 27 mL de sangre de la vena yugular en condiciones estériles en tres tubos vacutainer citrato sódico al 3,8%, 9 mL en cada tubo, y se realizó el posterior análisis de FC. Se recogió menos del 10% del volumen total de sangre en cada paciente y tras la extracción de sangre, cada gato recibió 27 mL de solución Ringer Lactato IV durante los primeros 30 minutos para restaurar el volumen vascular extraído y prevenir complicaciones como hipotensión o hipovolemia.

En los estudios de leucemia e inmunodeficiencia se recogieron solo 9 mL de sangre en condiciones estériles de la vena yugular mediante un tubo vacutainer citrato sódico al 3,8% (Tubos Colectores de Sangre[®], BTI Biotechnology Institute, Álava, España) para la preparación PRGF[®]-Endoret[®]. Finalmente, cada gato recibió 9 mL de solución IV Ringer Lactato durante los primeros 20 minutos para restaurar el volumen vascular y prevenir complicaciones hemodinámicas.

Preparación del PRP

La preparación del PRP se llevó a cabo según metodología PRGF[®]-Endoret[®] (Anitua 1999, Anitua, Sánchez et al. 2008, Anitua, Prado et al. 2017). En el primer estudio, las muestras de sangre de los gatos sanos fueron recogidas en tubos de citrato de sodio y fueron centrifugadas inmediatamente a temperatura ambiente, empleando para ello la centrífuga System IV[®] (BTI Biotechnology Institute S.L.) siguiendo tres protocolos diferentes:

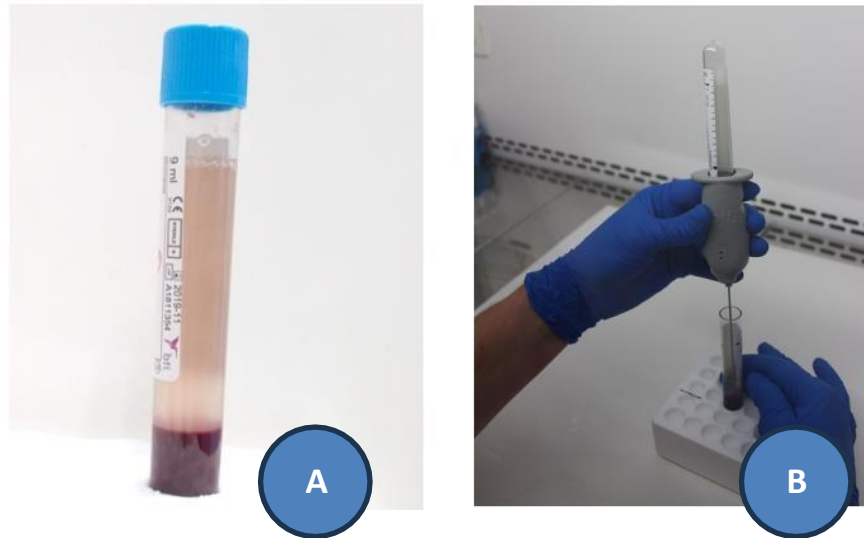
- **Protocolo A:** 255 g x 10 minutos.
- **Protocolo B:** 260 g x 10 minutos.
- **Protocolo C:** 265 g x 10 minutos.

Después de la centrifugación de la sangre, se obtuvieron tres capas diferenciadas: concentrado de RBCs, la capa leucocitaria (*buffy coat*) y la fracción plasmática (Figura 4A). A continuación, el plasma fue dividido en dos fracciones, las cuales fueron pipeteadas: la fracción considerada como PPP, correspondiente al 60% del volumen superior del plasma y, la fracción PRP, equivalente al

40% del plasma situado justo superior al *buffy coat*. El pipeteado del plasma se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar y siempre realizado por el mismo investigador. Las muestras pipeteadas fueron transferidas a tubos sin aditivo del propio kit (Figura 4B). A continuación, las diferentes fracciones plasmáticas fueron analizadas empleando el analizador hematológico automatizado Advia®2120i. Finalmente, PPP y PRP fueron activadas añadiendo cloruro cálcico al 10% correspondiente al 5% del volumen del plasma, para lograr la desgranulación de las PLTs y liberación de los FC obteniendo así PRGF. Las muestras obtenidas fueron inmediatamente congeladas en tubos eppendorf a temperatura de -80°C para, posteriormente, determinar las concentraciones de PDGF-BB y TGF- β 1.

En los posteriores estudios, tanto en gatos FeLV como en gatos FIV, una vez estandarizado el protocolo de centrifugación para la obtención de PRGF en el gato según resultados del estudio, se procedió a la centrifugación de las muestras sanguíneas empleando para ello una fuerza g de 265 durante 10 minutos. La centrifugación de las muestras permitió obtener dos fracciones: fracción PPP, correspondiente al 60% del volumen de plasma superior y, fracción PRP, considerando el 40% del plasma restante sobre la capa leucocitaria o también nombrada como "*buffy coat*". De nuevo, se siguió el mismo procedimiento que anteriormente descrito en gatos sanos: ambas fracciones fueron pipeteadas en condiciones estériles y siempre por el mismo investigador. Posteriormente, las muestras se transfirieron a tubos sin aditivos y su celularidad fue analizada. Además, las fracciones PPP y PRP se activaron agregando cloruro de calcio al 10% a razón del 5% del volumen del plasma garantizando así la obtención de PRGF con la desgranulación de las PLTs y liberación de los FC al medio. Finalmente, las muestras de plasma, determinadas como PPP y PRP fueron pipeteadas en tubos eppendorf e inmediatamente congeladas a temperatura de -80°C para posteriormente determinar la concentración de los factores PDGF-BB y TGF- β 1.

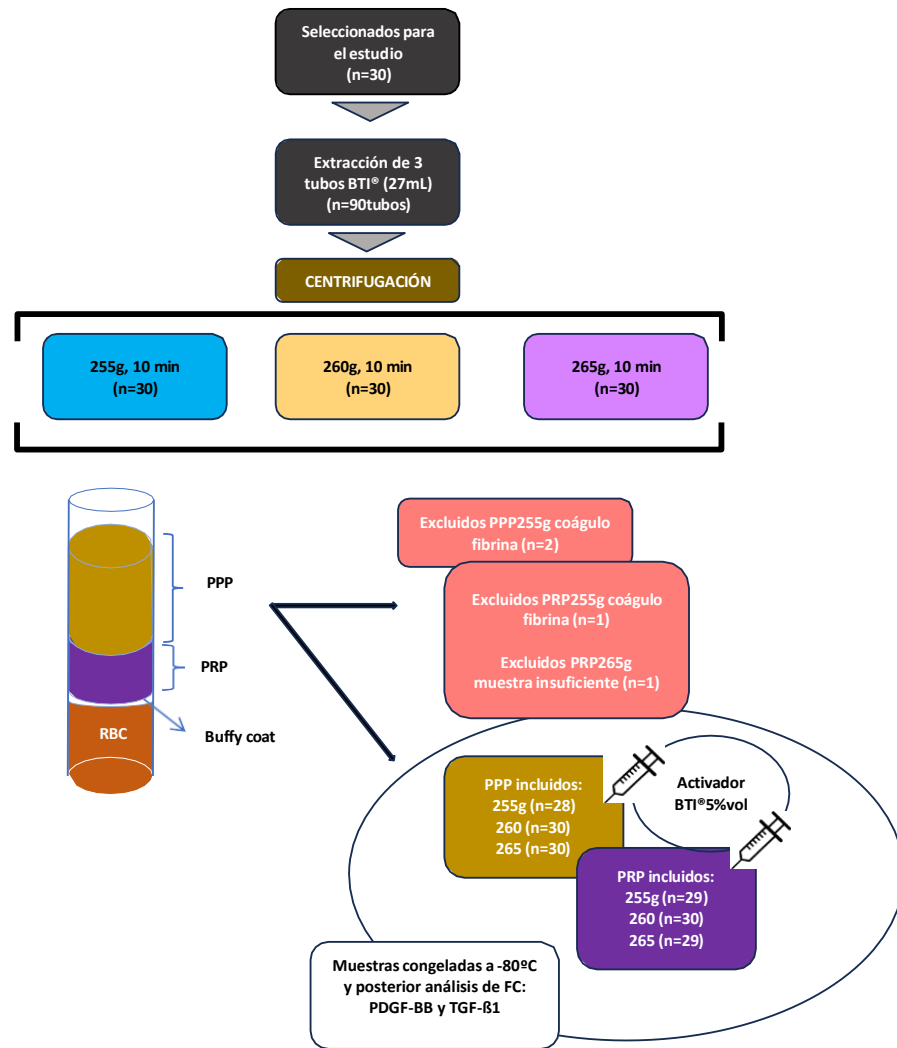
Figura 4. Obtención de PRGF®-Endoret®



A. Obtención de las diferentes fracciones sanguíneas en el tubo de sangre tras la centrifugación. GR: Glóbulos rojos, PPP: Plasma pobre en plaquetas, PRP: Plasma rico en Plaquetas; B. Pipeteado de PPP y PRP para su posterior contaje celular y, posterior activación con solución para activado del PRGF® (Cloruro cálcico 10%) previa congelación y análisis de factores de crecimiento: PDGF-BB y TGF- β 1.

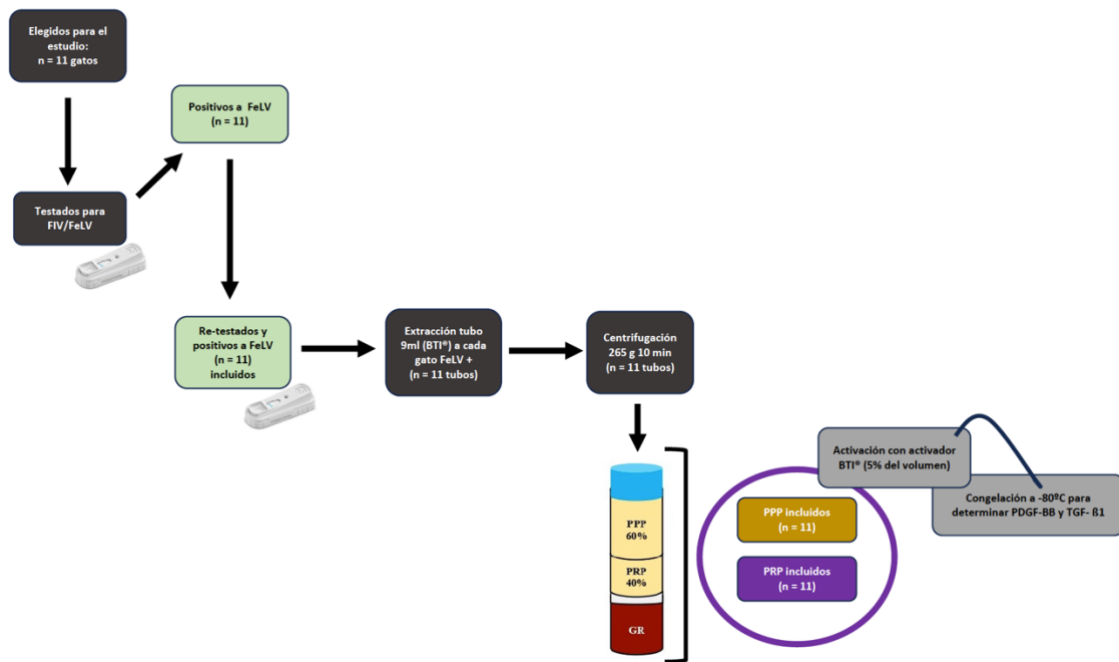
A continuación, a modo de esquema aparece representado el diseño del estudio en gatos sanos (Figura 5), así como el diseño del estudio en gatos FeLV (Figura 6) y en gatos FIV (Figura 7).

Figura 5. Esquematación del diseño del estudio: obtención de muestras de sangre, centrifugación siguiendo los tres protocolos mediante la metodología PRGF®-Endoret®, obtención de las fracciones PRP y PPP, posterior activación de ambas fracciones con activador BTI®.



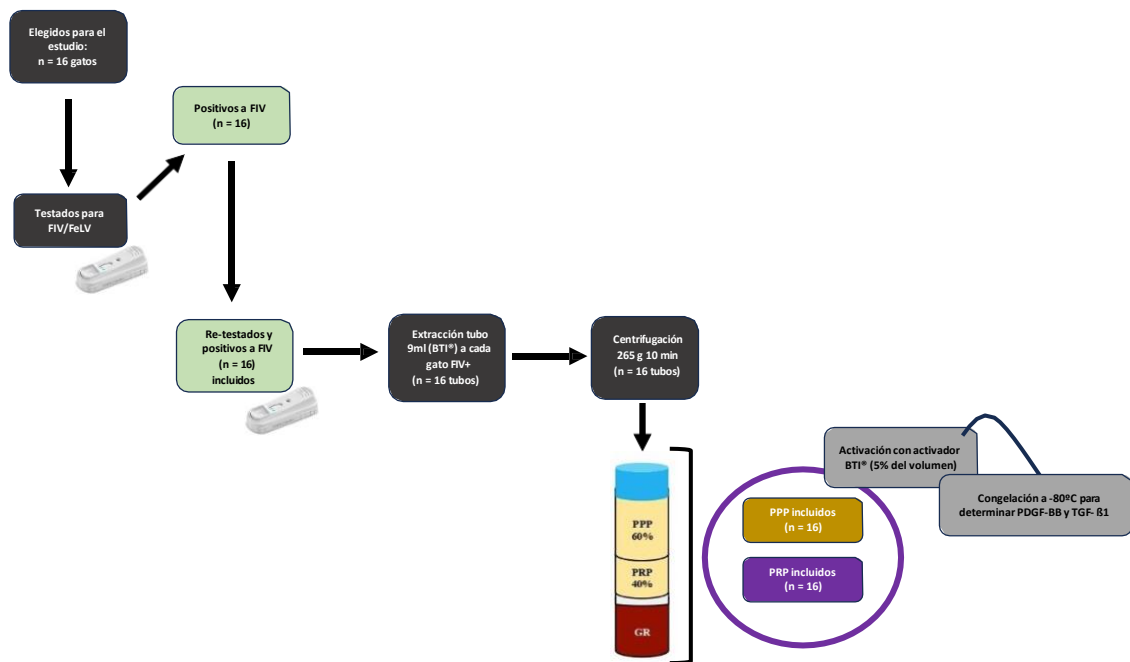
g: fuerza de centrifugación; PPP: Plasma Pobre en Plaquetas; PRP: Plasma Rico en Plaquetas; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta-1; PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas-BB.

Figura 6. Esquematación del diseño del estudio en gatos FeLV: obtención de muestras de sangre, centrifugación siguiendo el protocolo elegido cumpliendo la metodología PRGF®-Endoret®, obtención de las fracciones PRP y PPP, posterior activación de ambas fracciones con activador BTI® y congelación a -80°C para su posterior análisis de FC.



g: fuerza de centrifugación; PPP: Plasma Pobre en Plaquetas; PRP: Plasma Rico en Plaquetas; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta-1; PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas-BB.

Figura 7. Esquematización del diseño del estudio en gatos FIV: obtención de muestras de sangre, centrifugación siguiendo el protocolo elegido cumpliendo la metodología PRGF®-Endoret®, obtención de las fracciones PRP y PPP, posterior activación de ambas fracciones con activador BTI® y congelación a -80°C para su posterior análisis de FC.



g: fuerza de centrifugación; PPP: Plasma Pobre en Plaquetas; PRP: Plasma Rico en Plaquetas; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta-1; PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas-BB.

Análisis hematológico

El recuento de glóbulos rojos (RBC; M/ μ L), glóbulos blancos (WBC; K/ μ L), linfocitos (LYMPH; K/ μ L), monocitos (MON; K/ μ L), neutrófilos (NFS; K/ μ L), plaquetas (PLT; K/ μ L) y el recuento del volumen plaquetar medio (VPM; fL) fueron determinados en la sangre basal y en las fracciones PPP y PRP utilizando un analizador hematológico automatizado Advia® 2120i para su posterior estudio descriptivo y comparativo de las muestras.

El número absoluto de PLTs, así como la presencia de agregados plaquetares fueron verificados por el mismo clínico mediante frotis sanguíneo teñido con tinción de Romanowsky.

Cuantificación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) y factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1)

Las concentraciones de PDGF-BB y TGF- β 1 se midieron posterior a la activación y congelación a -80°C de las fracciones PPP y PRP para evaluar el efecto de la centrifugación en las PLTs y en los FC asociados.

TGF- β 1 y PDGF-BB se midieron utilizando kits ELISA (Human TGF- beta 1 DuoSet ELISA de R&D Systems DY240-05 y Human PDGF-BB DuoSet ELISA de R&D Systems DY220, respectivamente) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos FC se determinaron utilizando anticuerpos humanos ya que estos kits se han utilizado para los mismos fines en otros estudios de concentrados plaquetares en gatos (Arata, Ohmi et al. 2005, Silva, Alvarez et al. 2012) ya que se ha informado que el PDGF-BB humano y el felino presentan una alta homología de secuencia peptídica (Van den Ouweland, Van Groningen et al. 1987).

Método estadístico

El análisis estadístico se realizó con un software informático apropiado, IBM® SPSS® Statistics Versión 27. Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral se han analizado en varios apartados diferentes, en todos los análisis estadísticos, el nivel de significancia fue $p \leq 0,05$.

A continuación, se describen los análisis estadísticos empleados en cada uno de los apartados.

- Se realizó un estudio descriptivo de todos los valores, expresados en media \pm desviación estándar de la media, índice de confianza 95% (IC 95%) y máximo y mínimo de cada una de las variables estudiadas.
- Para el estudio de la elección del protocolo de centrifugación, en primer lugar, se comprobó la normalidad de los datos y la homogeneidad de las variables, mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. En segundo lugar, las variables en las que los datos cumplían con la normalidad se realizó un modelo mixto lineal seguido de post-hoc de Tukey para cada una de las variables. En este modelo, teniendo en cuenta a los pacientes como individuo, se tomó como factor entre-sujetos el protocolo de centrifugación aplicado (255 g, 260 g y 265 g), mientras que el factor intra-sujetos fue el tipo de muestra obtenida (sangre entera, PRP y PPP). En aquellos casos en los que los valores no cumplían con los criterios de normalidad se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para evaluar las diferencias estadísticas de los distintos protocolos de estudio, en cada una de las muestras evaluadas.

- La correlación entre variables se calculó con el coeficiente de Pearson cuando los datos cumplían con la normalidad y con el coeficiente de Spearman cuando la distribución no fue normal y/o las variables no eran homogéneas.

Resultados

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Resultados

A continuación, se exponen los resultados obtenidos durante la fase experimental de esta Tesis Doctoral en los diferentes estudios, recogidos en tablas y figuras. Todos los resultados se expresan como la media y la desviación típica para todas las variables estudiadas. En todos los casos se ha tomado como diferencia estadísticamente significativa un p -valor $< 0,05$.

Para una mejor exposición de los datos obtenidos, el apartado de resultados se ha dividido en los siguientes puntos:

- OBJETIVO 1: ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE CENTRIFUGACIÓN PRGF®-ENDORET® EN GATOS SANOS
 - Estudio descriptivo de los pacientes.
 - Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP.
 - Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC PDGF-BB y TGF- β 1 en las fracciones plasmáticas PPP y PRP.

- **OBJETIVO 2: INFLUENCIA DE FELV EN LA OBTENCIÓN DE PRGF®**
 - Estudio descriptivo de los pacientes FeLV.
 - Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP.
 - Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC PDGF-BB y TGF- β 1 en las fracciones plasmáticas PPP y PRP.
- **OBJETIVO 3: INFLUENCIA DE FIV EN LA OBTENCIÓN DE PRGF®**
 - Estudio descriptivo de los pacientes FIV.
 - Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP.
 - Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC PDGF-BB y TGF- β 1 en las fracciones plasmáticas PPP y PRP.

Objetivo 1: Estandarización del protocolo PRGF® en gatos

Estudio descriptivo de los animales

Para la realización del primer estudio se incluyeron un total de 30 animales, antes de comenzar la fase experimental todos los gatos fueron evaluados para determinar su estado de salud mediante una exploración física completa, hematología y bioquímica. Además, todos los pacientes debían tener un peso igual o superior a 4 kg para no superar el 10% del volumen de extracción sanguínea.

Todos los animales del estudio participaron por no presentar alteraciones analíticas ni en la exploración física. Fueron un total de 21 machos y 9 hembras, todos estaban esterilizados, con una edad media de 5,3 años (rango 2,7 – 7,9 años) y un peso medio de 6,0 kg (rango 4,87 – 7,13 kg).

Un total de 2 muestras PRP fueron descartadas del estudio, una de ellas al emplear el protocolo de 255 g por formación macroscópica de coágulo de fibrina y, una de ellas al emplear el protocolo 265 g por muestra insuficiente.

Dos muestras PPP fueron descartadas para el protocolo 255 g por formar coágulo de fibrina tras su centrifugación.

Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP

Concentración de PLTs, agregados plaquetares y VPM

Plaquetas

A continuación, se muestran los resultados del estudio descriptivo y comparativo de las PLTs (Tabla 2), VPM, (Tabla 3), RBCs (Tabla 4), WBCs (Tabla 5), LYMPH (Tabla 6), NFS (Tabla 7), MON (Tabla 8) en cada uno de los protocolos del estudio en gatos sanos.

En la tabla 2, se detallan los resultados de las PLTs obtenidos en los distintos grupos de muestras según para cada uno de los protocolos empleados, así como el estudio comparativo entre ellos.

Tabla 2: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de PLTs (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	SANGRE	30	328,50a	155,86	28,46	270,30	386,70	6,00	542,00
	PRP	29	462,10b	277,97	51,62	356,37	567,84	2,00	961,00
	PPP	28	293,54a	179,14	33,85	224,07	363,00	4,00	591,00
260 g	SANGRE	30	328,50a	155,86	28,46	270,30	386,70	6,00	542,00
	PRP	30	426,03b	307,19	56,09	311,33	540,74	2,00	1007,00
	PPP	30	300,80a	180,70	32,99	233,32	368,28	2,00	577,00
265 g	SANGRE	30	328,50a	155,86	28,46	270,30	386,70	6,00	542,00
	PRP	29	481,41b	275,00	51,07	376,81	586,02	11,00	1156,00
	PPP	30	293,33a	161,41	29,47	233,06	353,60	8,00	539,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras en cada protocolo del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Como podemos observar la media de las PLTs fue estadísticamente superior en la fracción PRP con respecto a la sangre basal ($p=0,026$). El valor medio de las PLTs en la fracción PRP según protocolo de centrifugación fue de: $462,1 \pm 277,9$ K/ μ L, $426,0 \pm 307,2$ K/ μ L y, $481,4 \pm 275,0$ K/ μ L, a centrifugaciones de 255 g, 260 g y 265 g, respectivamente (Tabla 2; Figura 8).

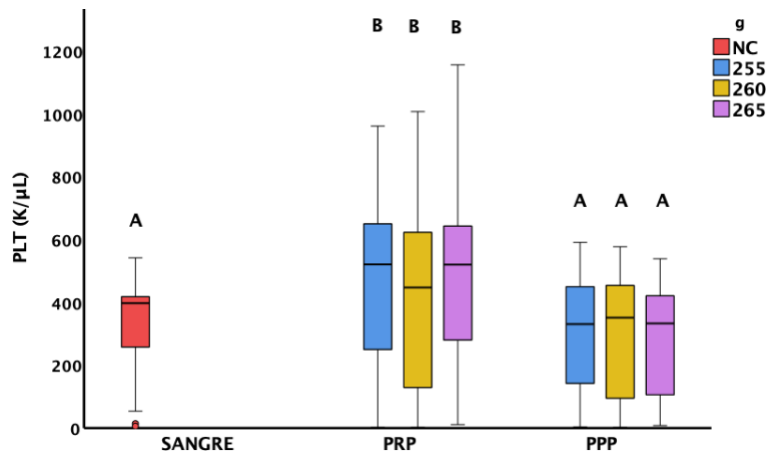
La concentración plaquetar fue registrada y comparada entre las diferentes fracciones y la sangre basal para los diferentes protocolos de centrifugación. En la fracción PRP se obtuvo una concentración de PLTs de 1,4 empleando 255 g en la centrifugación, un aumento de 1,3 empleando 260 g y 1,5 veces cuando la fuerza aumentó a 265 g, siempre con respecto a la sangre basal. Los resultados muestran una mayor concentración de PLTs a 265 g, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre protocolos de centrifugación (Figura 8).

En cuanto a la comparación de la concentración de las PLTs entre la fracción PPP y sangre basal no hubo diferencias significativas para ninguno de los protocolos.

Por otro lado, se estudió el porcentaje (%) de la concentración plaquetar en la fracción PRP con respecto a la sangre basal por rango según protocolo, obteniendo diferencias entre individuos. Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

- **Protocolo 255 g**, 10 minutos: 14 gatos (46,7%) concentraron más o igual de 1,5 veces, 10 animales (33,3%) entre 0,5 y 1,49 veces y, 6 gatos (20%) concentraron menos de 0,5 veces las PLTs.
- **Protocolo 260 g**, 10 minutos: 11 gatos (38%) concentraron más o igual a 1,5 veces, 11 gatos (38%) entre 0,5 y 1,49 veces y, 7 gatos (24%) concentraron menos de 0,5 veces las PLTs.
- **Protocolo 265 g**, 10 minutos: 13 gatos (43,3%) concentraron más o igual a 1,5 veces, 14 gatos (46,6%) entre 0,5 y 1,49 veces y, 3 gatos (10%) concentraron menos de 0,5 veces las PLTs.

Figura 8. Evaluación de la concentración de PLTs en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra.

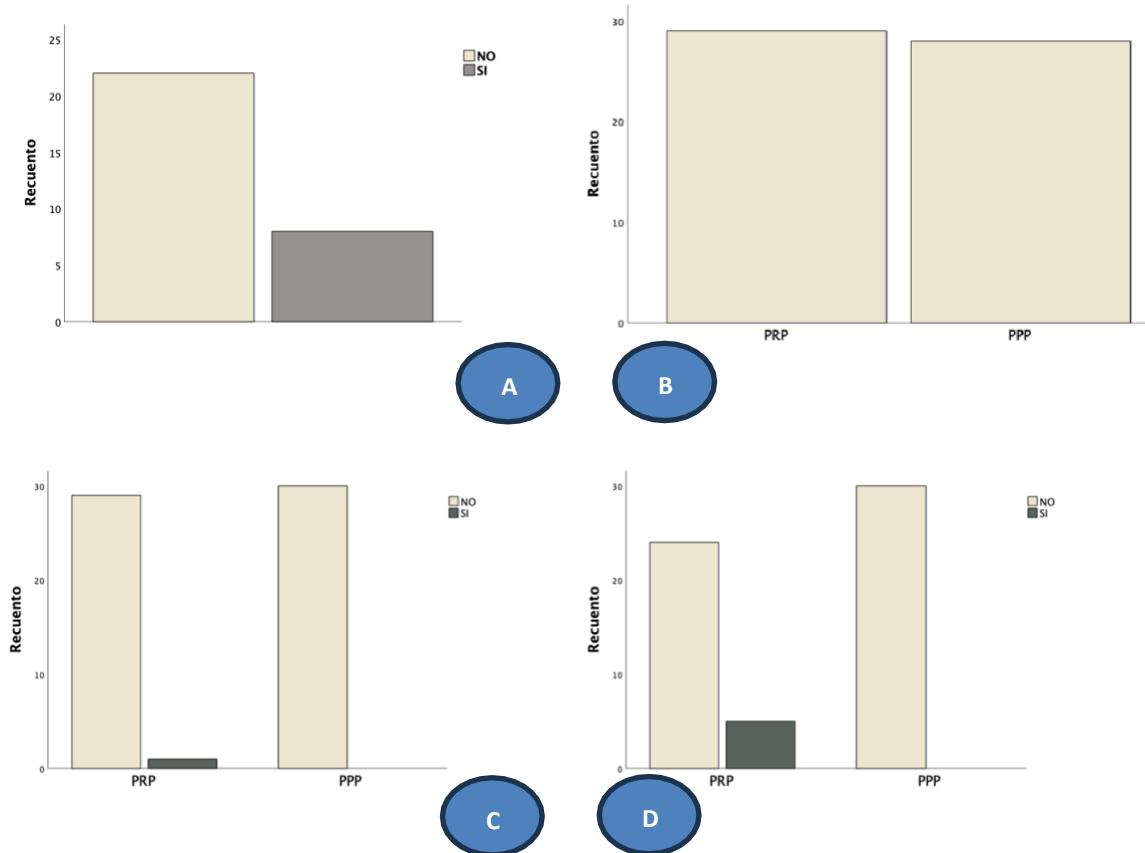


PLT: plaquetas, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, g: fuerza de centrifugación, NC: No centrifugada. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Agregados plaquetares

Se analizaron un total de 206 muestras, de las cuales 14 presentaron agregados plaquetares, 8 de sangre basal (27%) y 6 de PRP (7%), de las cuales empleando el protocolo 255 g no se obtuvieron agregados en la fracción PRP, sin embargo, a 260 g solo una muestra de PRP tuvo agregados plaquetares y 5 muestras en el protocolo 265 g (Figura 9). De acuerdo con los criterios ADVIA 2120i (Mitander W. 2008) y el número de agregados plaquetares en los frotis observados, 13 de las 14 muestras mostraron de 1 a 7 agregados plaquetares con más de 10 PLTs cada uno, mientras que la muestra restante mostró más de 50 PLTs en cada agregado plaquetar.

Figura 9. Presencia de agregados plaquetarios en las muestras de gatos sanos.



A. Agregados en muestras basales; B. Agregados en muestras empleando protocolo 255 g; C. Agregados en muestras empleando protocolo 260 g; D. Agregados en muestras empleando protocolo 265 g.

Volumen plaquetar medio (VPM)

Se obtuvo un valor de VPM superior en las muestras de sangre basal analizadas con respecto a las fracciones PRP y PPP ($p < 0,001$), sin diferencias estadísticamente significativas entre protocolos ni fracciones plasmáticas (tabla 3).

Adicionalmente, se analizó la posible correlación existente entre este valor y la presencia de agregados plaquetarios, observando una correlación positiva entre ambos valores ($r = 0,559$; $p < 0,001$).

A continuación, se presentan los resultados descriptivos y comparación obtenidos con relación al VPM según los diferentes protocolos de centrifugación en la tabla 3.

Tabla 3: Estudio descriptivo y comparativo de VPM (fL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	SANGRE	30	16,34 ^a	5,06	0,92	14,45	18,23	10,10	28,70
	PRP	29	11,76 ^b	2,00	0,37	11,00	12,52	6,00	15,90
	PPP	28	11,25 ^b	1,68	0,32	10,60	11,90	7,10	14,00
260 g	SANGRE	30	16,34 ^a	5,06	0,92	14,45	18,23	10,10	28,70
	PRP	30	11,89 ^b	2,57	0,47	10,93	12,85	6,20	18,00
	PPP	30	11,26 ^b	1,56	0,29	10,68	11,85	8,20	15,30
265 g	SANGRE	30	16,34 ^a	5,06	0,92	14,45	18,23	10,10	28,70
	PRP	29	12,38 ^b	2,35	0,44	11,49	13,28	9,70	19,60
	PPP	30	11,41 ^b	1,76	0,32	10,75	12,07	9,30	17,40

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Concentración de RBCs

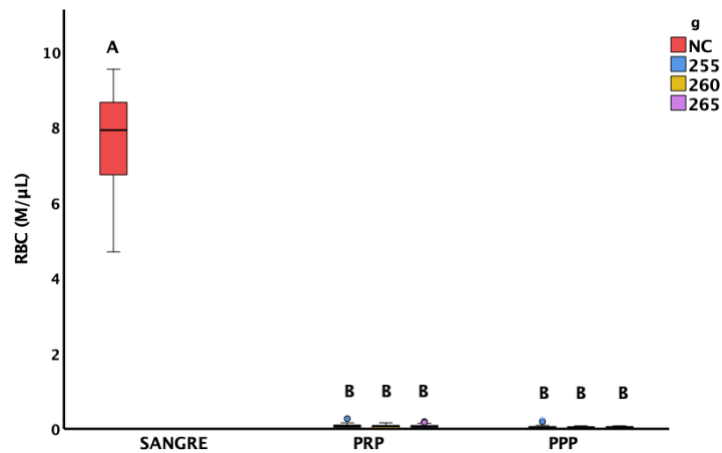
El número medio de RBCs fue estadísticamente superior en sangre basal que en las fracciones PRP y PPP ($p < 0,001$). No se identificaron diferencias significativas en relación con este parámetro entre ambas fracciones plasmáticas. En comparación con el valor inicial, el número de RBCs se redujo en un 99% en todas las muestras analizadas, sin diferencias estadísticamente significativas entre protocolos de centrifugación utilizados en el estudio (Tabla 4; Figura 10).

Tabla 4: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de RBCs (M/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	SANGRE	30	7,65 ^a	1,23	0,22	7,19	8,11	4,70	9,50
	PRP	29	0,07 ^b	0,06	0,01	0,05	0,10	0,00	0,30
	PPP	28	0,05 ^b	0,06	0,01	0,03	0,07	0,00	0,30
260 g	SANGRE	30	7,65 ^a	1,23	0,22	7,19	8,11	4,69	9,53
	PRP	30	0,07 ^b	0,04	0,01	0,05	0,08	0,01	0,16
	PPP	30	0,04 ^b	0,02	0,00	0,03	0,04	0,00	0,08
265 g	SANGRE	30	7,65 ^a	1,23	0,22	7,19	8,11	4,69	9,53
	PRP	29	0,07 ^b	0,05	0,01	0,05	0,09	0,01	0,19
	PPP	30	0,04 ^b	0,02	0,00	0,03	0,05	0,00	0,08

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 10. Evaluación de la concentración de RBCs en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra.



RBC: eritrocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, g: fuerza de centrifugación, NC: No centrifugada. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °
Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Concentración WBCs

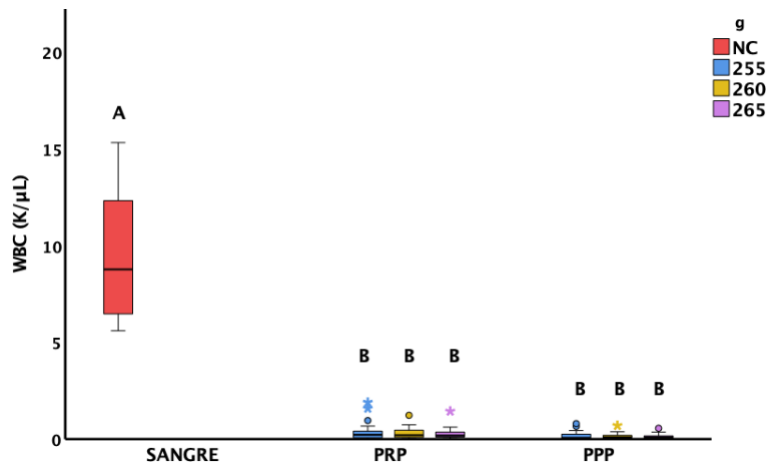
El número medio de WBCs fue estadísticamente mayor en las muestras de sangre basal que en las fracciones PRP y PPP ($p < 0,001$), sin diferencias estadísticas entre ellas. En comparación con el valor inicial, el número de WBCs disminuyó más del 95% en las fracciones PRP y PPP, sin diferencias significativas entre los protocolos (Tabla 5; Figura 11).

Tabla 5: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de WBCs (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	SANGRE	30	9,46a	3,18	0,58	8,27	10,65	5,60	15,30
	PRP	29	0,35b	0,45	0,08	0,18	0,52	0,00	1,90
	PPP	28	0,17b	0,20	0,04	0,09	0,25	0,00	0,80
260 g	SANGRE	30	9,46a	3,18	0,58	8,27	10,65	5,60	15,32
	PRP	30	0,28b	0,26	0,05	0,18	0,38	0,03	1,23
	PPP	30	0,15b	0,15	0,03	0,09	0,20	0,01	0,70
265 g	SANGRE	30	9,46a	3,18	0,58	8,27	10,65	5,60	15,32
	PRP	29	0,27b	0,28	0,05	0,16	0,38	0,02	1,44
	PPP	30	0,12b	0,12	0,02	0,08	0,17	0,01	0,56

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 11. Evaluación de la concentración de WBCs en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra.



WBC: glóbulos blancos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, g: fuerza de centrifugación, NC: No centrifugada. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Se decidió un análisis más exhaustivo de los WBCs, diferenciando sus poblaciones, se detallan a continuación:

Linfocitos (LYMPH)

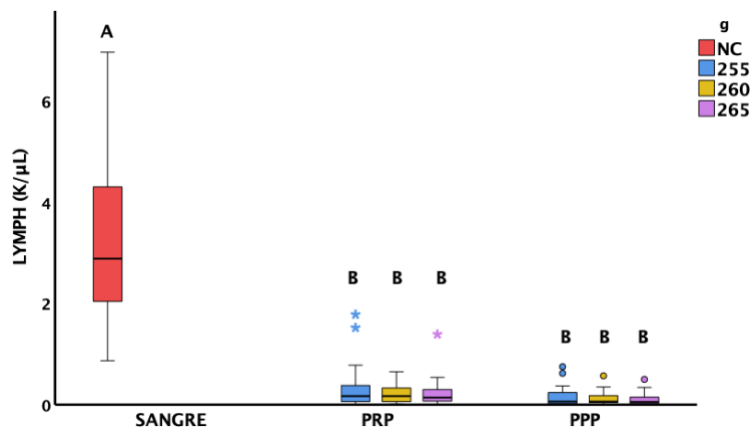
El recuento de LYMPH fue estadísticamente superior en sangre basal comparado con las fracciones PRP y PPP ($p < 0,001$), disminuyendo su concentración en más de un 90% en la fracción PRP y en un 95% en la fracción PPP, sin diferencias estadísticas entre protocolos de centrifugación (Tabla 6; Figura 12).

Tabla 6: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de LYMPH (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	SANGRE	30	3,11a	1,53	0,28	2,53	3,68	0,87	6,96
	PRP	29	0,30b	0,42	0,08	0,14	0,46	0,00	1,78
	PPP	28	0,15b	0,19	0,04	0,07	0,22	0,01	0,75
260 g	SANGRE	30	3,11a	1,53	0,28	2,53	3,68	0,87	6,96
	PRP	30	0,21b	0,18	0,03	0,15	0,28	0,01	0,65
	PPP	30	0,12b	0,13	0,02	0,07	0,17	0,00	0,57
265 g	SANGRE	30	3,11a	1,53	0,28	2,53	3,68	0,87	6,96
	PRP	29	0,25b	0,31	0,03	0,18	0,31	0,00	1,78
	PPP	30	0,12b	0,15	0,02	0,09	0,15	0,00	0,75

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 12. Evaluación de la concentración de LYMPH en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra.



*LYMPH: linfocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, g: fuerza de centrifugación, NC: No centrifugada. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.*

Neutrófilos (NFS)

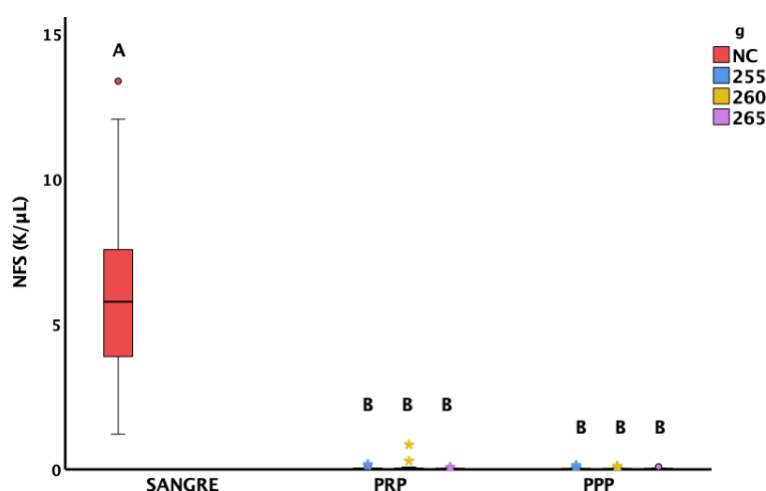
En comparación con las fracciones plasmáticas, el recuento de NFS fue estadísticamente superior en sangre basal ($p < 0,001$), disminuyendo su concentración en un 99% en PRP y PPP. No se obtuvieron diferencias significativas entre los protocolos de centrifugación (Tabla 7; Figura 13).

Tabla 7: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de NFS (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	SANGRE	30	5,95a	2,90	0,53	4,86	7,03	1,21	13,35
	PRP	29	0,03b	0,04	0,01	0,02	0,05	0,00	0,17
	PPP	28	0,02b	0,03	0,01	0,01	0,04	0,00	0,14
260 g	SANGRE	30	5,95a	2,90	0,53	4,86	7,03	1,21	13,35
	PRP	30	0,06b	0,16	0,03	0,00	0,12	0,00	0,85
	PPP	30	0,02b	0,03	0,01	0,01	0,03	0,00	0,12
265 g	SANGRE	30	5,95a	2,90	0,53	4,86	7,03	1,21	13,35
	PRP	29	0,04b	0,10	0,01	0,02	0,06	0,00	0,85
	PPP	30	0,02b	0,03	0,00	0,02	0,03	0,00	0,14

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 13. Evaluación de la concentración de NFS en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra.



NFS: neutrófilos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, g: fuerza de centrifugación, NC: No centrifugada. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Monocitos (MON)

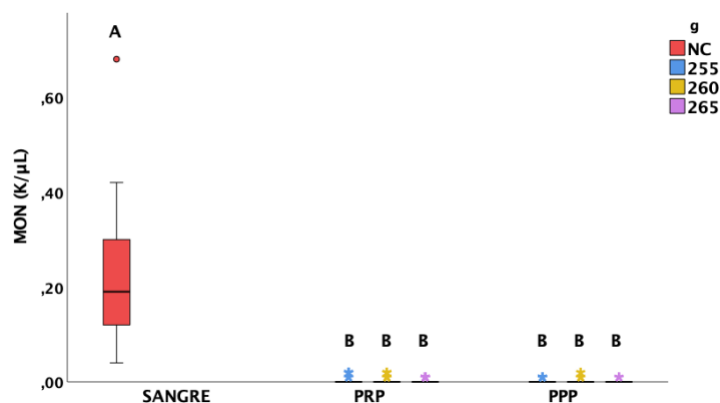
El recuento de MON fue estadísticamente superior en las muestras de sangre basal comparado con las fracciones PRP y PPP tras la centrifugación ($p < 0,001$), disminuyendo su concentración en un 100% en ambas fracciones plasmáticas sin diferencias significativas entre los protocolos (Tabla 8; Figura 14).

Tabla 8: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de MON (K/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	SANGRE	30	0,22a	0,14	0,03	0,16	0,27	0,04	0,68
	PRP	29	0,00b	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02
	PPP	28	0,00b	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
260 g	SANGRE	30	0,22a	0,14	0,03	0,16	0,27	0,04	0,68
	PRP	30	0,00b	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
	PPP	30	0,00b	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
265 g	SANGRE	30	0,22a	0,14	0,03	0,16	0,27	0,04	0,68
	PRP	29	0,00b	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
	PPP	30	0,00b	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 14. Evaluación de la concentración de MON en los distintos protocolos de centrifugación en los diferentes tipos de muestra.



MON: monocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, g: fuerza de centrifugación, NC: No centrifugada. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC

PDGF-BB

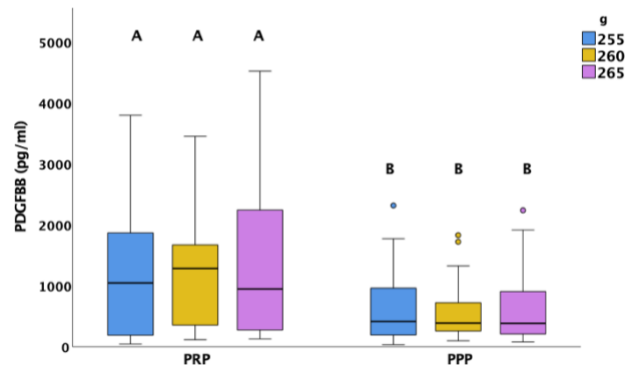
Las concentraciones medias de PDGF-BB en la fracción PRP según protocolo (255 g 10 min, 260 g 10 min y 265 g 10 min) ($1281,9 \pm 1110,5$; $1271,8 \pm 965,7$ y $1346,6 \pm 1197,8$ pg/mL, respectivamente) fueron estadísticamente superiores a las de la fracción PPP ($649,6 \pm 596,8$ pg/mL; $559,9 \pm 462,5$ y $616,6 \pm 556,6$ pg/mL) ($p < 0,001$). El análisis de la variación no reveló significación estadística en las concentraciones de PDGF-BB según los protocolos de centrifugación utilizados en el estudio (Tabla 9; Figura 15). La presencia de agregados plaquetarios no afectó a las concentraciones de PDGF-BB en las fracciones de PRP.

Tabla 9: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de PDGF-BB (pg/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	PRP	29	1281,9a	1110,53	206,22	859,4	1704,3	45	3795
	PPP	28	649,7b	596,83	110,83	422,6	876,7	34	2315
260 g	PRP	30	1271,85a	965,69	176,31	911,25	1632,44	115	3450
	PPP	30	559,99b	462,52	84,44	387,28	732,7	98	1829
265 g	PRP	29	1346,57a	1197,80	222,43	890,95	1802,19	129,00	4518,00
	PPP	30	616,64b	556,59	101,62	408,81	824,47	80,00	2237,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 15. Evaluación de la concentración de PDGF-BB según protocolo de centrifugación en los diferentes tipos de fracción plasmática.



PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, g: fuerza de centrifugación, NC: No centrifugada. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

TGF- β 1

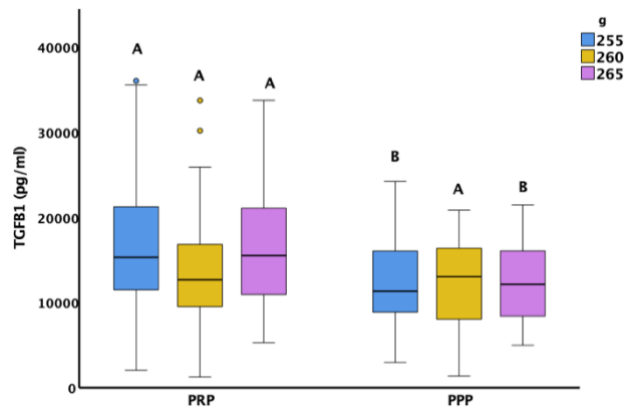
Las concentraciones medias de TGF- β 1 en la fracción PRP ($17450,3 \pm 10105,3$ y $17085,9 \pm 7988,9$ pg/mL) fueron estadísticamente superiores a las de la fracción PPP ($12441,1 \pm 5165,9$ y $12404,1 \pm 4539,6$ pg/mL) cuando se utilizaron protocolos de centrifugación a 255 g ($p=0,017$) y 265 g ($p=0,002$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la fracción PRP y PPP empleando el protocolo a 260 g. No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de TGF- β 1 entre los protocolos de centrifugación (Tabla 10; Figura 16). La presencia de agregados tampoco afectó las concentraciones de TGF- β 1 en las fracciones de PRP.

Tabla 10: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de TGF- β 1 (pg/mL) en gatos sanos en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
255 g	PRP	29	17450,4a	10105,31	1876,51	13606,5	21294,2	2051	36025
	PPP	28	12441,1b	5165,97	959,3	10476,1	14406,1	2968	24226
260 g	PRP	30	14193,89^	7705,72	1406,87	11316,53	17071,26	1260,00	33725,00
	PPP	30	12499,17x	4962,94	906,11	10645,97	14352,36	1360,00	20848,00
265 g	PRP	29	17085,94a	7988,96	1483,51	14047,10	20124,78	5295,00	33725,00
	PPP	30	12404,14b	4539,67	828,83	10709,00	14099,28	4984,00	21463,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 16. Evaluación de la concentración de TGF- β 1 según protocolo de centrifugación en los diferentes tipos de fracción plasmática.



TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta-1, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, g: fuerza de centrifugación, NC: No centrifugada. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras. *: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Objetivo 2: Evaluación del Plasma Rico en Plaquetas (PRGF®-Endoret®) en gatos con leucemia: Valoración de PDGF-BB y TGF- β 1.

Estudio descriptivo de los animales

De los 14 gatos incluidos inicialmente en el estudio, 3 de ellos fueron excluidos: dos presentaron anemia moderada y uno dio negativo en la segunda prueba para FeLV. Un total de 11 gatos cumplieron los criterios de inclusión, 6 machos y 5 hembras, con edades comprendidas entre 1,5 y 6,5 años (Media: 4,4 años; DE: 1,6 años), y un peso entre 3,7 kg y 5,8 kg (Media: 4,7 kg; DE: 0,7 kg), todos ellos esterilizados.

Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP

Los datos hematológicos y el estudio comparativo entre sangre basal, PPP y PRP para las diferentes líneas celulares empleando el protocolo 265 g durante 10 minutos de centrifugación quedan reflejadas en las tablas 11-19.

Concentración de PLTs, agregados plaquetares y VPM

Plaquetas

El número medio de PLTs fue estadísticamente superior en la fracción PRP ($392,1 \pm 130,7$ PLTs) comparado con la fracción PPP ($260,8 \pm 83,9$ PLTs) ($p=0,024$) y sangre basal ($307,3 \pm 106,2$ PLTs) ($p=0,043$) sin diferencias estadísticas entre sangre basal y PPP (Tabla 11; Figura 17).

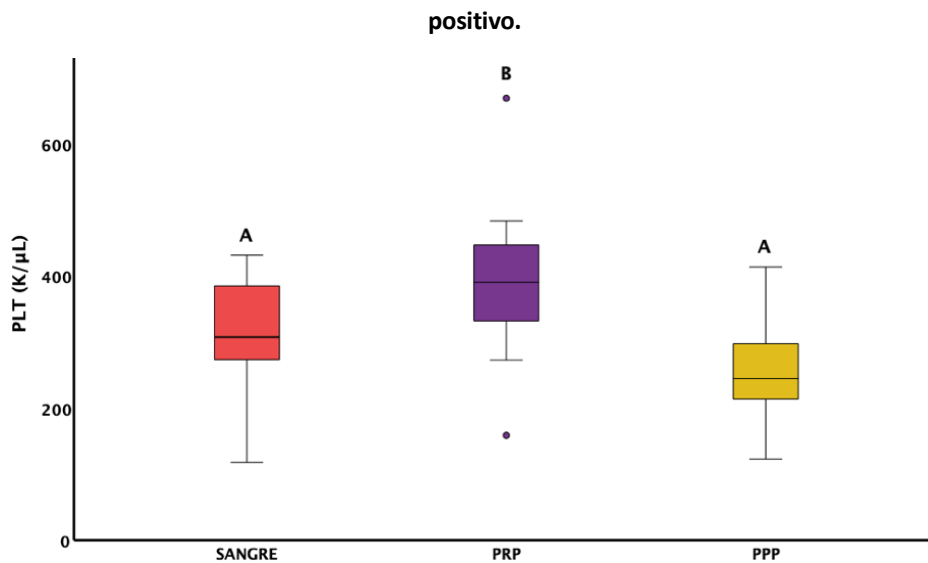
Tabla 11: Estudio descriptivo y comparativo de las concentraciones de PLTs (K/mL) en gatos FeLV en los diferentes protocolos de centrifugación.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	11	307,27a	106,20	32,02	235,92	378,62	118,00	432,00
	PRP	11	392,09b	130,67	39,40	304,30	479,88	159,00	670,00
	PPP	11	260,82a	83,93	25,31	204,43	317,21	123,00	414,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

A continuación, la figura 17 representa los datos extraídos del estudio comparativo según tipo de muestra.

Figura 17. Evaluación de la concentración de PLTs en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV



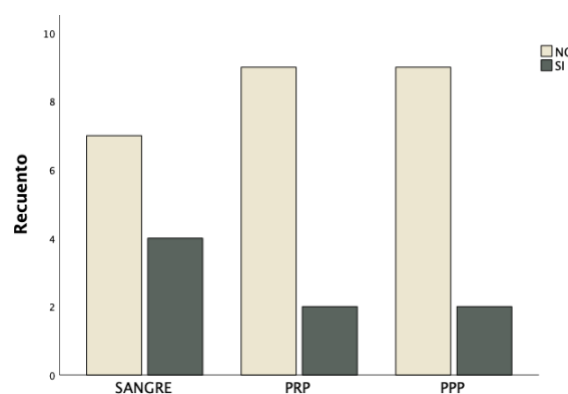
PLT: plaquetas, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Agregados plaquetares

Los agregados plaquetares se encontraron presentes en 4 (36%) de las muestras de sangre basal. En las fracciones plasmáticas, las muestras que presentaron agregados en las PLTs fueron 2 (18%) de PRP y 2 (18%) de PPP (Figura 18).

Según la equivalencia entre los agregados plaquetares por ADVIA 2120i (Mitander W. 2008), de las 8 muestras totales con agregados, 7 presentaron de 1 a 7 agregados con más de 10 PLTs por campo, y una muestra presentó de 1 a 3 agregados con más de 50 PLTs por campo.

Figura 18. Presencia de agregados en muestras de gatos FeLV.



PRP: Plasma Rico en Plaquetas; PPP: Plasma Pobre en Plaquetas.

VPM

El análisis estadístico de las muestras no mostró diferencias significativas para el valor VPM entre sangre basal, PRP y PPP (Tabla 12).

Tabla 12: Estudio descriptivo y comparativo de VPM (fL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	11	17,04a	5,29	1,59	13,48	20,59	10,00	27,70
	PRP	11	14,06a	3,63	1,09	11,62	16,50	11,00	23,80
	PPP	11	13,33a	3,42	1,03	11,03	15,63	9,90	22,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Concentración de RBCs

La concentración de RBCs fue estadísticamente superior en sangre basal comparado con las fracciones PRP y PPP ($p < 0,001$), sin diferencias entre ambas fracciones plasmáticas (Tabla 13; Figura 19).

El protocolo de centrifugación establecido de 265 g durante 10 minutos consiguió reducir en un 99% el número total de RBCs en la fracción PPP y PRP.

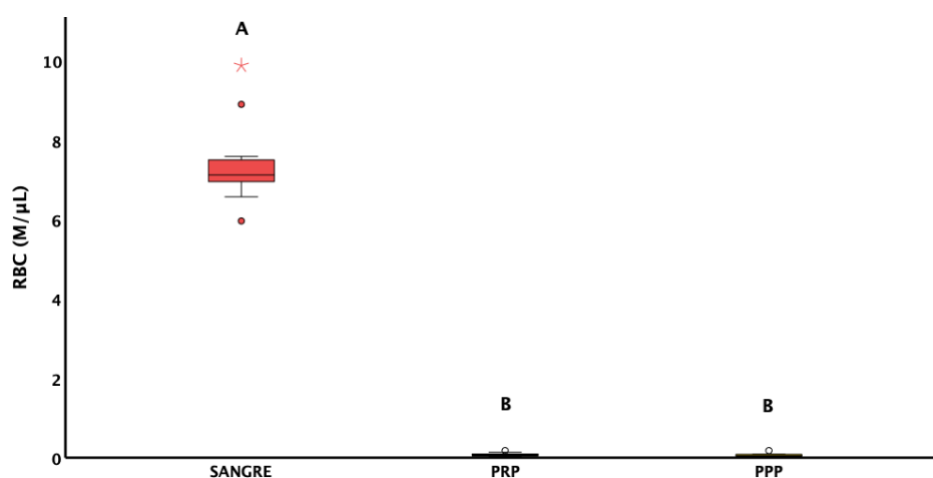
Tabla 13: Estudio descriptivo y comparativo de RBCs (M/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	11	7,42a	1,09	0,33	6,69	8,15	5,97	9,89
	PRP	11	0,08b	0,05	0,01	0,05	0,11	0,02	0,18
	PPP	11	0,06b	0,05	0,01	0,03	0,09	0,02	0,18

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

En la figura 19 se representa el estudio comparativo según datos extraídos para la variable RBCs en gatos FeLV.

Figura 19. Evaluación de la concentración de RBCs en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo.



RBC: eritrocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Concentración de WBCs

El número total de WBCs en sangre basal fue estadísticamente superior en comparación con la fracción PRP y PPP ($p < 0,001$), sin diferencias estadísticas entre ellas (Tabla 14).

La concentración media de WBCs se consiguió reducir en un 95% en la fracción PRP y hasta un 97% en la fracción PPP (Figura 20).

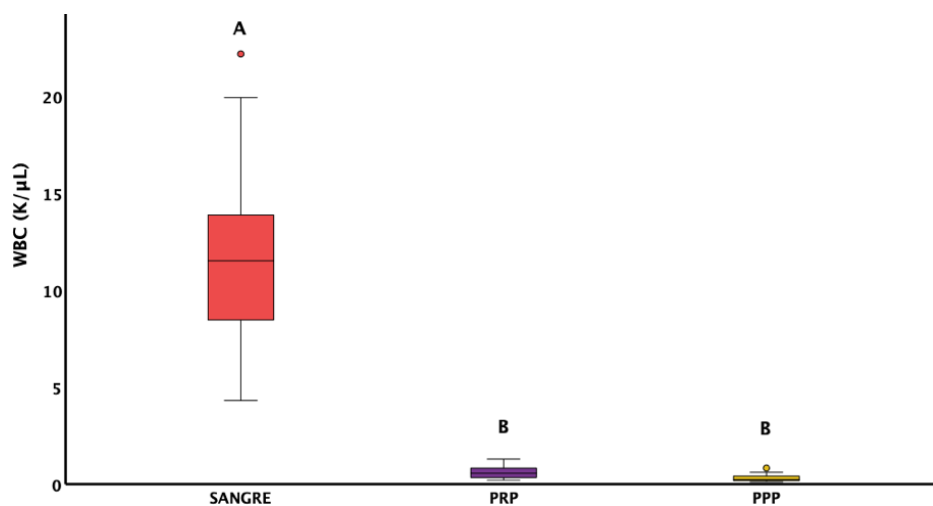
Tabla 14: Estudio descriptivo y comparativo de WBCs (K/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	11	12,07 ^a	5,40	1,63	8,44	15,69	4,31	22,18
	PRP	11	0,64 ^b	0,34	0,10	0,41	0,87	0,21	1,29
	PPP	11	0,32 ^b	0,23	0,07	0,17	0,48	0,12	0,83

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

La figura 20 representa los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos tipos de muestra en gatos FeLV.

Figura 20. Evaluación de la concentración de WBCs en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo.



WBC: glóbulos blancos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Linfocitos (LYMPH)

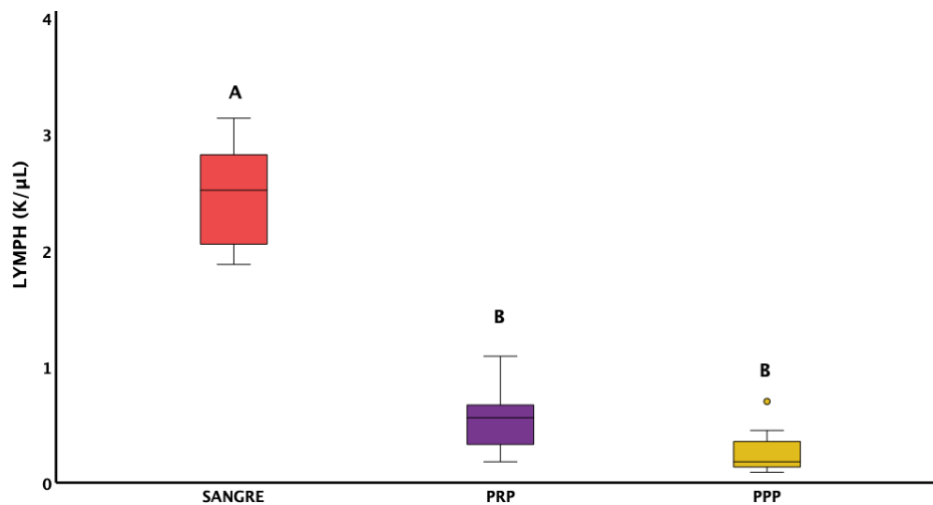
El recuento de LYMPH fue estadísticamente superior en sangre basal comparado con las fracciones PRP y PPP ($p < 0,001$), disminuyendo su concentración en un 88% en ambas fracciones plasmáticas, como puede observarse en la tabla 15 y figura 21.

Tabla 15: Estudio descriptivo y comparativo de LYMPH (K/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	11	2,47 ^a	0,48	0,14	2,15	2,79	1,88	3,14
	PRP	11	0,54 ^b	0,26	0,08	0,37	0,72	0,18	1,09
	PPP	11	0,27 ^b	0,19	0,06	0,14	0,39	0,09	0,70

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 21. Evaluación de la concentración de LYMPH en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo.



LYMPH: linfocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Neutrófilos (NFS)

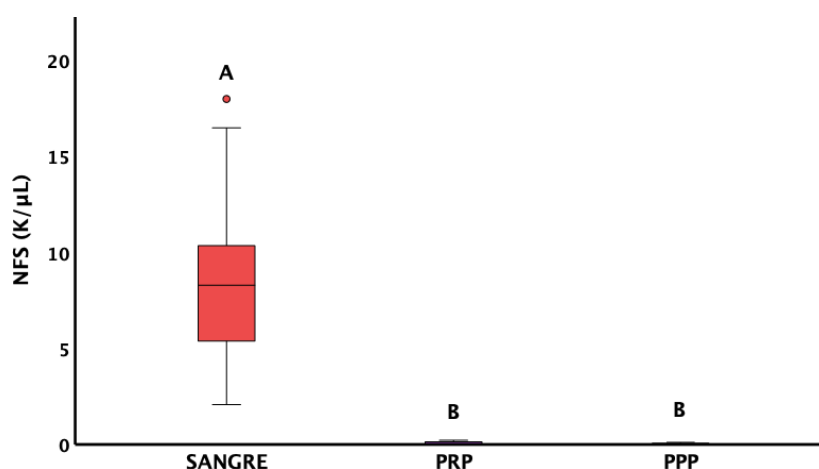
El recuento de NFS fue estadísticamente superior en sangre basal comparado con las fracciones PRP y PPP ($p < 0,001$), disminuyendo su concentración en un 99% en PRP y PPP. Estos valores se recogen en la tabla 16, quedando representados en la figura 22.

Tabla 16: Estudio descriptivo y comparativo de NFS (K/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	11	8,75a	5,00	1,51	5,39	12,10	2,07	17,96
	PRP	11	0,07b	0,08	0,02	0,02	0,13	0,00	0,22
	PPP	11	0,04b	0,03	0,01	0,01	0,06	0,00	0,11

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 22. Evaluación de la concentración de NFS en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo.



NFS: neutrófilos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Monocitos (MON)

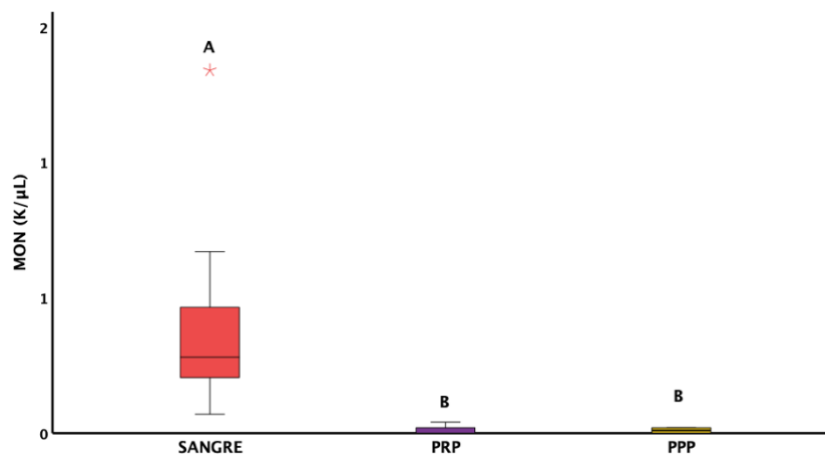
El recuento de MON fue estadísticamente superior en las muestras de sangre basal con respecto a las fracciones plasmáticas ($p < 0,001$). La concentración de MON se redujo en un 97% en las fracciones PRP y PPP comparado con la sangre basal (Tabla 17; Figura 23).

Tabla 17: Estudio descriptivo y comparativo de MON (K/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	11	0,3a	0,2	0,11	0,16	0,64	0,07	1,34
	PRP	11	0,01b	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,04
	PPP	11	0,01b	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 23. Evaluación de la concentración de MON en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo.



MON: monocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado*: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC

PDGF-BB

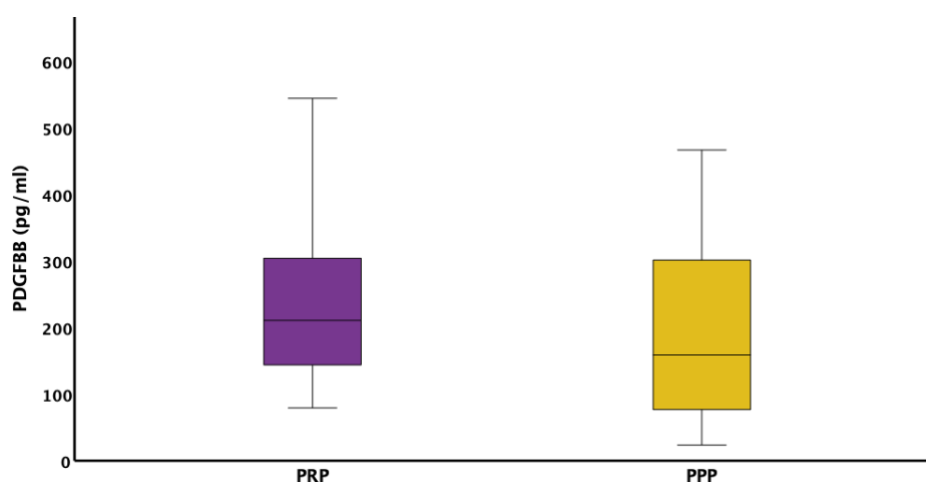
No se encontraron cambios estadísticamente significativos para la concentración de PDGF-BB entre PRP y PPP. Los datos descriptivos y el estudio comparativo entre las diferentes fracciones plasmáticas quedan representados en la tabla 18 y figura 24. Sin embargo, los niveles de este FC fueron estadísticamente superiores en las muestras con presencia de agregados plaquetares en comparación a aquellas muestras sin agregados ($p < 0,001$; $r = 0,9$).

Tabla 18: Estudio descriptivo y comparativo de PDGF-BB (pg/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	PRP	11	248,34	152,30	45,92	146,02	350,66	79,00	544,00
	PPP	11	198,51	143,19	43,17	102,31	294,71	24,00	467,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 24. Evaluación de la concentración de PDGF-BB en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo.



PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

TGF- β 1

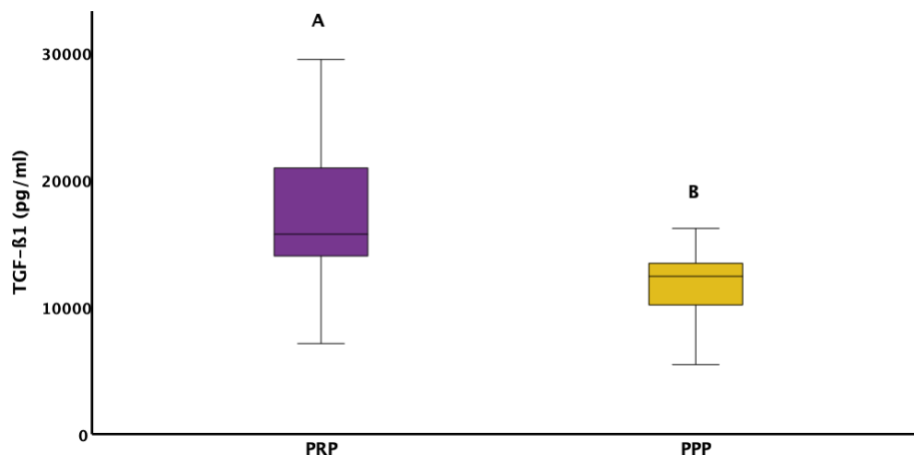
Los niveles de TGF- β 1 fueron estadísticamente superiores en la fracción PRP en comparación a la fracción PPP ($p=0,02$) (Tabla 19; Figura 25), no viéndose afectada su concentración ante la presencia de agregados plaquetares en la muestra plasmática.

Tabla 19: Estudio descriptivo y comparativo de TGF- β 1 (pg/mL) en gatos FeLV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	PRP	11	17556,91a	7084,24	2135,98	12797,65	22316,16	7135,00	29523,00
	PPP	11	11487,30b	3427,71	1033,49	9184,53	13790,06	5481,00	16209,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 25. Evaluación de la concentración de TGF- β 1 en los diferentes tipos de muestra en gatos FeLV positivo.



TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta-1, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Objetivo 3: Caracterización del PRGF en gatos infectados por el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV): análisis celular y de los factores de crecimiento PDGF-BB y TGF- β 1.

Estudio descriptivo de los animales

Se recolectó sangre de un total de 16 gatos adultos asintomáticos con FIV. Se correspondieron 1 hembra esterilizada y 15 machos castrados. El peso medio fue de 5,2 kg (rango de 3,4 – 5,4 kg) y la edad media fue de 5,3 años (rango de 2 - 9 años).

Estudio descriptivo y comparativo del análisis de células en sangre basal y las diferentes fracciones plasmáticas PPP y PRP

Concentración de PLTs, agregados plaquetares y VPM

Plaquetas

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la media de PLTs en la fracción PRP ($359,3 \pm 90,6$ PLTs) y la fracción PPP ($258,8 \pm 79,6$ PLTs) ($p=0,007$), sin diferencias estadísticas entre las muestras de sangre basal y PRP o entre sangre basal y PPP (Tabla 20; Figura 26).

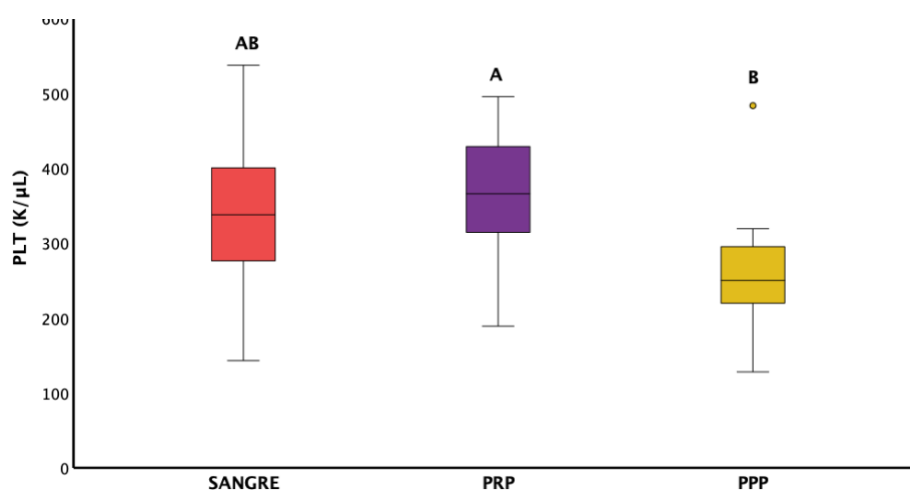
Tabla 20: Estudio descriptivo y comparativo de PLTs (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	16	329,50 ^{ab}	94,74	23,68	279,02	379,98	143,00	537,00
	PRP	16	359,31 ^a	90,62	22,66	311,02	407,60	189,00	495,00
	PPP	16	258,75 ^b	79,55	19,89	216,36	301,14	128,00	483,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras. $p<0,05$: estadísticamente significativo.

En la figura 26 se pueden observar los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos tipos de muestra de los gatos FIV positivo.

Figura 26. Evaluación de la concentración de PDGF-BB en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo.

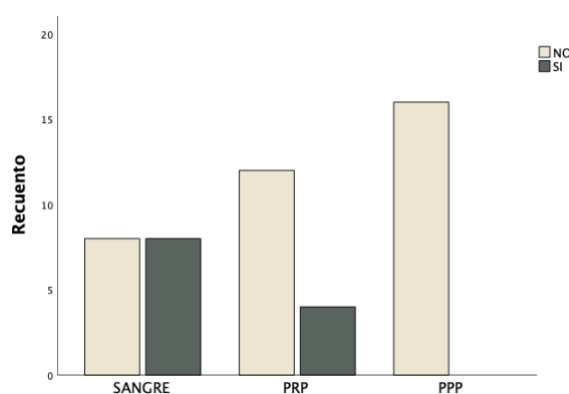


PLTs: plaquetas, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °: Círculos outlier. $p<0,05$: estadísticamente significativo.

Agregados plaquetares

Del total de las 48 muestras analizadas, se obtuvieron agregados plaquetares en 8 (50%) muestras de sangre basal y en 4 (25%) muestras de PRP (Figura 27). Según los criterios establecidos para ADVIA 2120i (Mitander W. 2008), y el número de agregados PLTs en los frotis, todas las muestras mostraron de 1 a 7 agregados plaquetares con más de 10 PLTs cada uno.

Figura 27. Presencia de agregados en muestras de gatos FIV.



PRP: Plasma Rico en Plaquetas; PPP: Plasma Pobre en Plaquetas.

Volumen plaquetar medio (VPM)

El VPM fue estadísticamente mayor en sangre basal respecto a la fracción PRP y PPP ($p=0,001$ y $p<0,001$, respectivamente) sin diferencias estadísticas entre PRP y PPP (Tabla 21).

Tabla 21: Estudio descriptivo y comparativo de VPM (fL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	16	18,63a	3,08	0,77	16,99	20,27	13,40	24,90
	PRP	16	14,85b	2,82	0,71	13,35	16,35	11,40	20,30
	PPP	16	14,11b	2,46	0,61	12,80	15,41	10,80	19,60

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p<0,05$: estadísticamente significativo.

Concentración de RBCs

La concentración media de RBCs en las fracciones PRP y PPP fueron de $0,07 \pm 0,02$ M/ μ L y $0,04 \pm 0,02$ M/ μ L, respectivamente, disminuyendo significativamente en un 99% en comparación con las muestras de sangre basal ($7,7 \pm 1,3$ M/ μ L) ($p < 0,001$), sin diferencias significativas entre las fracciones PRP y PPP (Tabla 22; Figura 28).

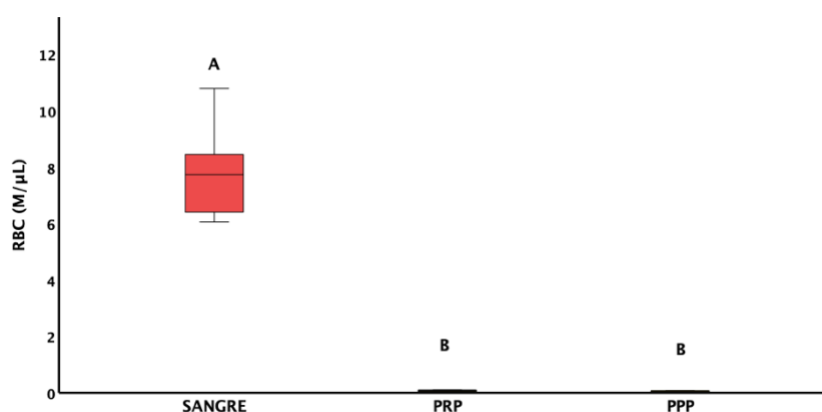
Tabla 22: Estudio descriptivo y comparativo de RBCs (M/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	16	7,72a	1,30	0,33	7,02	8,41	6,06	10,80
	PRP	16	0,07b	0,03	0,01	0,06	0,08	0,03	0,10
	PPP	16	0,05b	0,03	0,01	0,03	0,06	0,02	0,08

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

A continuación, la figura 28 muestra los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos tipos de muestra de los gatos FIV positivo.

Figura 28. Evaluación de la concentración de RBCs en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo.



RBC: eritrocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Concentración de WBCs

En comparación con la sangre basal (WBCs: $11,4 \pm 5,2$ K/ μ L), la concentración media de WBCs en las fracciones PRP y PPP ($0,9 \pm 0,7$ K/ μ L y $0,5 \pm 0,5$ K/ μ L, respectivamente) disminuyó significativamente en un 92% ($p < 0,001$) en todas las muestras analizadas (Tabla 23; Figura 29).

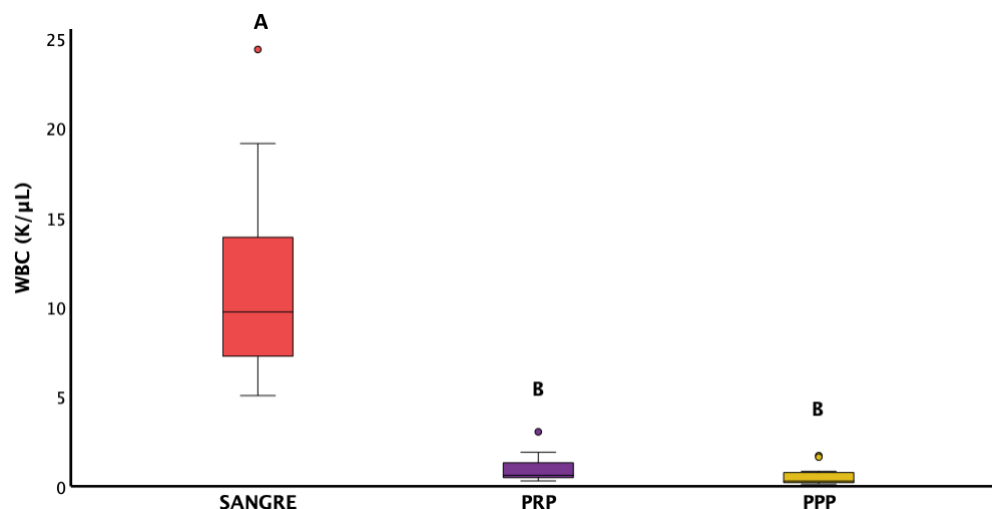
Tabla 23: Estudio descriptivo y comparativo de WBCs (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	16	11,36a	5,19	1,30	8,60	14,13	5,06	24,40
	PRP	16	0,93b	0,72	0,18	0,54	1,31	0,30	3,04
	PPP	16	0,55b	0,50	0,13	0,29	0,82	0,12	1,71

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

En la figura 29 se reflejan los datos extraídos del estudio comparativo entre los distintos tipos de muestra de los gatos FIV positivo

Figura 29. Evaluación de la concentración de WBCs en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo.



WBC: glóbulos blancos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Linfocitos (LYMPH)

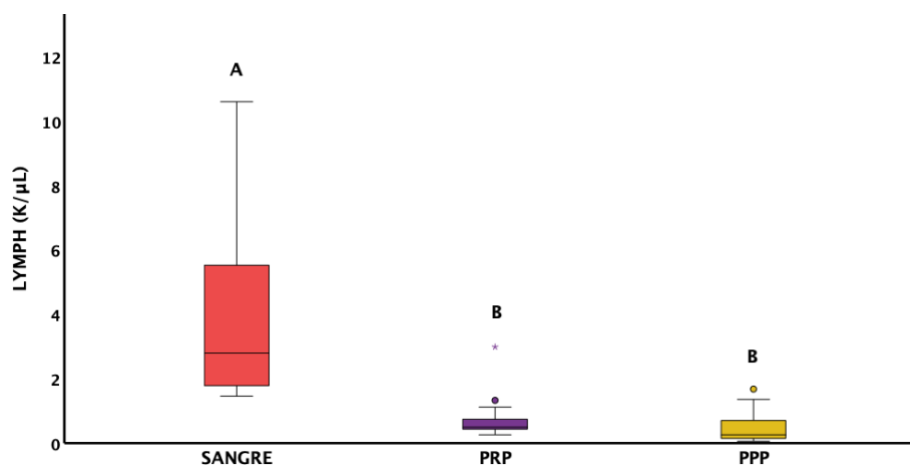
En comparación con la sangre basal, el número de LYMPH disminuyó significativamente en un 81% ($p < 0,001$) y 86,5% ($p < 0,001$) en las fracciones PRP y PPP, respectivamente (Tabla 24; Figura 30).

Tabla 24: Estudio descriptivo y comparativo de LYMPH (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	16	3,80 ^a	2,65	0,66	2,38	5,21	1,46	10,61
	PRP	16	0,74 ^b	0,67	0,17	0,38	1,09	0,26	2,99
	PPP	16	0,50 ^b	0,47	0,12	0,24	0,75	0,06	1,68

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 30. Evaluación de la concentración de LYMPH en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo.



LYMPH: linfocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Neutrófilos (NFS)

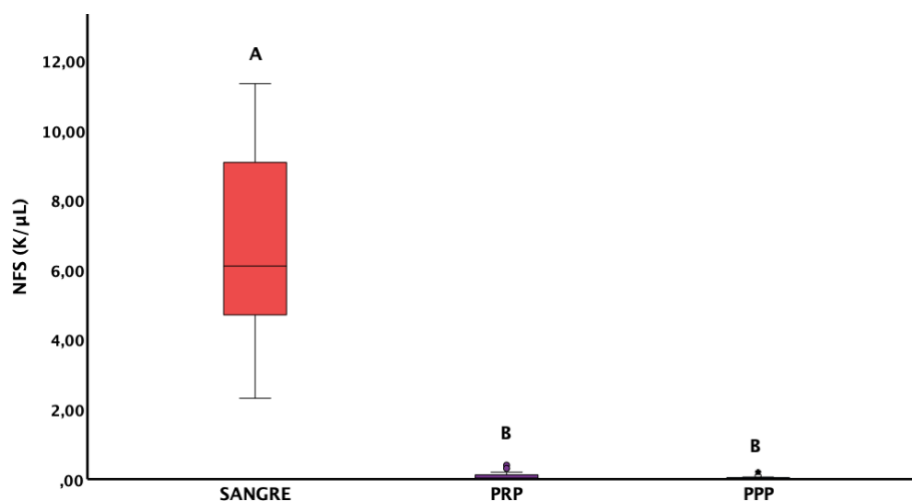
La concentración media de NFS disminuyó significativamente en un 99% tanto en las fracciones PRP como PPP con respecto a la sangre basal ($p < 0,001$) (Tabla 25; Figura 31).

Tabla 25: Estudio descriptivo y comparativo de NFS (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	16	6,87a	2,78	0,69	5,39	8,35	2,32	11,34
	PRP	16	0,09b	0,12	0,03	0,03	0,16	0,01	0,40
	PPP	16	0,04b	0,05	0,01	0,01	0,07	0,00	0,20

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 31. Evaluación de la concentración de NFS en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo.



NFS: neutrófilos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Monocitos (MON)

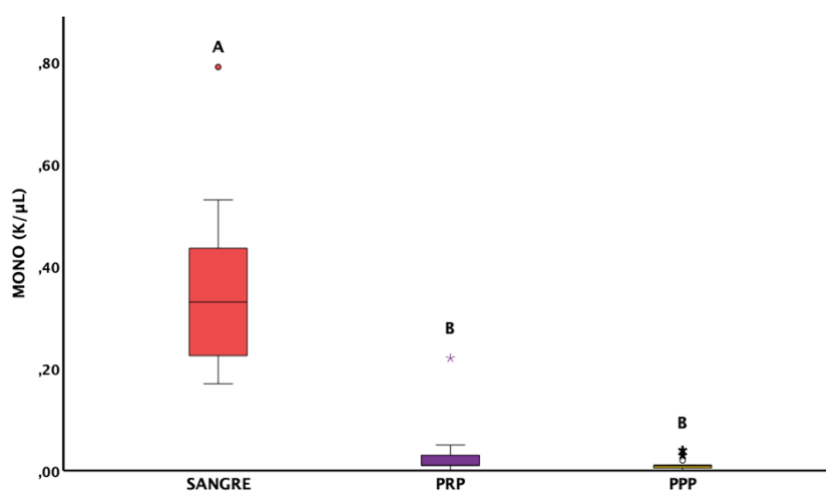
Las concentraciones medias de MON comparadas con la sangre basal, disminuyeron significativamente en un 90% en la fracción PRP y en un 97% en la fracción PPP ($p < 0,001$) (Tabla 26, Figura 32).

Tabla 26: Estudio descriptivo y comparativo de MON (K/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	SANGRE	16	0,35 ^a	0,16	0,04	0,27	0,44	0,17	0,79
	PRP	16	0,03 ^b	0,05	0,01	0,00	0,06	0,00	0,22
	PPP	16	0,01 ^b	0,01	0,00	0,01	0,02	0,00	0,04

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 32. Evaluación de la concentración de MON en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo.



*MON: monocitos, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. *: Datos anómalos, no incluidos en el estudio. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.*

Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Estudio descriptivo y comparativo de la concentración de los FC

PDGF-BB

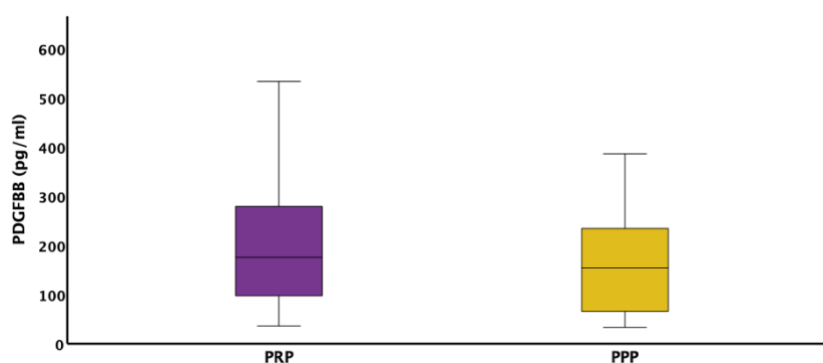
No hubo diferencias significativas para los niveles del FC PDGF-BB entre las fracciones PRP y PPP (Tabla 27; Figura 33). La presencia de agregados plaquetares en las muestras afectó estadísticamente a la concentración de PDGF-BB.

Tabla 27: Estudio descriptivo y comparativo de PDGF-BB (pg/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	PRP	16	199,80	133,89	33,47	128,45	271,15	36,00	534,00
	PPP	16	159,76	104,03	26,01	104,33	215,19	33,00	387,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 33. Evaluación de la concentración de PDGF-BB en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo.



PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. $p < 0,05$: estadísticamente significativo

TGF- β 1

Las concentraciones de TGF- β 1 fueron significativamente mayores en el PRP que en las fracciones PPP ($p=0,02$) (Tabla 28; Figura 34).

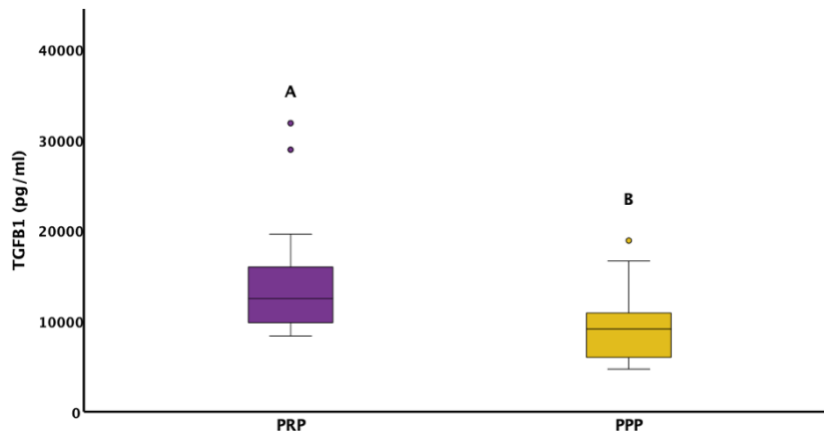
En comparación con las muestras sin agregados, las concentraciones de TGF- β 1 son mayores en las muestras con agregados plaquetares ($p = 0,03$; $r = 0,6$).

Tabla 28: Estudio descriptivo y comparativo de TGF- β 1 (pg/mL) en gatos FIV positivo en las diferentes fracciones plasmáticas.

PROTOCOLO	MUESTRA	N	MEDIA	DE	EE	IC 95%		MIN	MAX
						LIM INF.	LIM SUPER.		
265 g	PRP	16	16	14381,89 ^a	7044,55	1761,14	10628,12	18135,67	8351,00
	PPP	16	16	9403,73 ^b	4031,92	1007,98	7255,27	11552,19	4713,00

g: fuerza gravitacional, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas, N: tamaño de la muestra, DE: desviación estándar, EE: error estándar, IC: intervalo de confianza, LIM INF: límite inferior, LIM SUPER: límite superior. Las diferentes letras indican diferencias entre las muestras y protocolos del estudio. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Figura 34. Evaluación de la concentración de TGF- β 1 en los diferentes tipos de muestra en gatos FIV positivo.



TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta-1, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, PPP: Plasma Pobre en Plaquetas. Diferentes letras indican diferencias entre las muestras según protocolo empleado. °: Círculos outlier. $p < 0,05$: estadísticamente significativo.

Discusión

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Discusión

Para un mejor entendimiento de los resultados obtenidos en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral, se expondrá la discusión de forma independiente para cada uno de ellos.

Estudio 1: Optimización del protocolo PRGF® en gatos

Concentración plaquetar

En este estudio se buscaba el protocolo de centrifugación más ajustado a la tecnología PRGF®-Endoret®, para ello se han comparado 3 protocolos de centrifugación diferentes variando las g (255 g, 260 g, 265 g) y con una duración de la centrifugación de 10 minutos en todos los protocolos. De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio según los diferentes protocolos de centrifugación, con el protocolo de 265 g se consiguió un enriquecimiento medio de PLTs en las preparaciones de PRGF®-Endoret® en gatos sanos de 1,5 veces (147%) las PLTs basales, protocolo similar al buscado. Resultados similares a los publicados en la bibliografía documentada acerca de PRGF®-Endoret® en otras especies como el conejo o el perro, donde este sistema comercial aumenta las PLTs en la fracción PRP en 1,5 veces la línea de base (Damià Giménez, Carrillo Poveda et al. 2012, Ikumi, Hara et al. 2018). Los protocolos de centrifugación utilizados en estos estudios exponen una concentración media de PLTs superior a 300.000 PLTs/ μ L, considerada como la

concentración mínima requerida para ser un concentrado plaquetar de calidad según Anitua y colaboradores (Anitua, Andia et al. 2004). No obstante, algunos estudios en humana han descrito rangos de PLTs moderados (1,5 a 2 veces el valor basal o, de 1,3 a 4 veces las PLTs basales) para proporcionar un mayor beneficio clínico (Anitua, Sánchez et al. 2009, Carmona, López et al. 2012, Anitua, Zalduendo et al. 2013, Dhurat and Sukesh 2014), resultados similares a los obtenidos aplicando los protocolos de 255 g y 260 g, que fueron de 1.4 (140%) y 1,3 (130%), respectivamente. Se ha documentado que existen variaciones en las concentraciones de PLTs, WBCs y RBCs en los protocolos de obtención de PRP para una especie determinada (Castillo, Pouliot et al. 2011, Carr, Canapp et al. 2015, Franklin, Garner et al. 2015). Del mismo modo, un protocolo establecido para una especie en concreto sufre variaciones al reproducirlo en especies diferentes (Stief, Gottschalk et al. 2011, Chun, Canapp et al. 2020). Un estudio publicado por Boswell y colaboradores expuso que algunos individuos pueden no concentrar satisfactoriamente las PLTs con un determinado sistema, pero pueden hacerlo empleando otro sistema comercializado (Boswell, Cole et al. 2012). Por tanto, es posible que no se genere PRP en todos los casos para un sistema concreto. Se sugiere que debería realizarse un conteo celular completo del supuesto PRP obtenido a cada paciente, de este modo el clínico podría asegurar la aplicación de PRP en cada individuo y los estudios obtener mayor relevancia (Boswell, Cole et al. 2012). En nuestro trabajo, coincidiendo con lo expuesto anteriormente, no hemos obtenido resultados uniformes en todas las muestras analizadas debido a las características individuales y a la variabilidad de cada paciente.

Las publicaciones acerca de concentrados plaquetares en el gato son muy escasas y no hay publicados datos específicos acerca del rango exacto de PLTs requerido en la fracción plasmática para considerarse como PRP en esta especie. De hecho, aunque varios métodos comerciales mostraron aumentos de PLTs entre 151% y 187% con respecto a la sangre basal en gatos, no obtuvieron concentraciones de PLTs por encima del rango ideal reportado (Silva, Alvarez et al. 2012, Chun, Canapp et al. 2020, Ferrari and Schwartz 2020). Comparando nuestro estudio con publicaciones previas en gatos, Silva y colaboradores recolectaron las muestras sanguíneas en tubos de 8,5 mL, obteniendo un aumento de PLTs con respecto a la sangre basal de 187% empleando un protocolo de centrifugación de 85 g durante 6 minutos (Silva, Alvarez et al. 2012). Chun y colaboradores recolectaron las muestras sanguíneas de los gatos en tubos de 12,5 mL y sometieron a las muestras a un protocolo de doble centrifugación. Después de la primera centrifugación a 3.600 revoluciones por minuto (rpm) durante 1 minuto, la fracción plasmática fue aspirada y centrifugada de nuevo durante 5 minutos a 3,800 rpm obteniendo una concentración plaquetar del 151% con respecto a la sangre basal (Chun, Canapp et al. 2020). Autores como Ferrari y colaboradores compararon en gatos dos sistemas comercializados para

perros. En el primer sistema se recolectó un volumen sanguíneo de 13,5 mL con 1,5 mL de anticoagulante ACD-A y se llevó a cabo una centrifugación simple a 1.300 rpm durante 5 minutos. En el segundo sistema empleado se recolectó un volumen sanguíneo a cada paciente de 12,5 mL con 2,5 mL de ACD-A, sometiendo las muestras a una primera centrifugación de 3.600 rpm durante 1 minuto. Tras esta centrifugación se transfirió la fracción plasmática y *buffy coat* a una segunda centrifugación a 3.800 rpm durante 5 minutos. El sistema 1 no permitió una concentración plaquetar, de hecho, disminuyó el número de PLTs en un 3% con respecto a la sangre basal, probablemente debido a una fuerza de centrifugación excesiva. Sin embargo, el sistema 2 permitió la concentración de las PLTs en un 187% comparado con las muestras de sangre basal (Ferrari and Schwartz 2020). No obstante, este sistema no es comparable al buscado en este estudio ya que uno de los objetivos del sistema PRGF®-Endoret® es el empleo de una centrifugación única.

En nuestro estudio, siguiendo las recomendaciones de PRGF®-Endoret®, se emplearon tubos de recolección sanguínea de 9 mL y un protocolo de centrifugación simple. Debido a la necesidad de optimizar el protocolo, la g fue modificada según 3 protocolos estudiados (255 g, 260 g y 265 g) siempre con una variable tiempo de 10 minutos. Teniendo en cuenta las publicaciones previas, los autores manifiestan que factores como el volumen de muestra basal, la fuerza gravitacional, el número de centrifugaciones y el tiempo de centrifugación empleados en los diferentes protocolos, podrían ser los responsables de las variaciones observadas entre estudios, ya que el recuento de PLTs en la sangre basal de los gatos de los diferentes estudios fueron muy similares. Nos gustaría enfatizar también que, algunas características como el modelo o el diámetro de la centrífuga, así como las g aplicadas no fueron especificados en los estudios mencionados anteriormente, por lo que los autores consideran importante la necesidad de detallarlos para la caracterización del producto PRP específico en cada especie por un sistema determinado y poder compararlos con otros sistemas disponibles en el mercado.

Pureza del PRP obtenido

La obtención de PRP dota de un elevado interés en el campo de la medicina regenerativa desde hace más de tres décadas, principalmente por la acción regenerativa de los FC presentes en el interior de las PLTs (Marx 2001). Hay muchos sistemas de purificación de PRP disponibles comercialmente (Wasterline, Braun et al. 2012), lo que supone variabilidad en el PRP obtenido en término de concentración de PLTs, WBCs, RBCs y FC (Dhurat and Sukesh 2014). La tecnología PRGF®-Endoret® es un tipo de PRP adquirido a partir de pequeños volúmenes de sangre mediante

un único proceso de centrifugación y posterior pipeteado del plasma. Emplear un volumen pequeño de sangre para la obtención de PRP es importante en la práctica del gato, ya que, debido al pequeño tamaño de esta especie el volumen de sangre total requerido podría considerarse un factor limitante. El volumen de sangre extraído en nuestro estudio no superó el volumen máximo de extracción permitido en ningún gato (Davidow 2013, Ferrari and Schwartz 2020), garantizando así una correcta volemia y perfusión en cada paciente.

La tecnología PRGF®-Endoret® cataloga a su producto hemoderivado como un P-PRP, está moderadamente enriquecido en PLTs, no contiene RBCs ni WBCs, y su activación se realiza con cloruro de calcio (Anitua, Sánchez et al. 2007). Estos criterios se cumplen en los 3 protocolos utilizados en nuestro estudio, en los que la presencia de células que puedan alterar la eficacia de este producto en el control de la inflamación y regeneración de los tejidos, como los RBCs y WBCs se redujeron a valores cercanos a cero. Resultados similares fueron mostrados por Ferrari y Schwartz utilizando un sistema de centrifugación simple (1.300 rpm x 5 min), sin embargo, cuando utilizaron un sistema de centrifugación doble (3.600 rpm x 1 min y 3.800 rpm x 5 min), se informó una reducción del 80% en los WBCs, lo que resultó en un producto lejos de cumplir el canon P-PRP. Existen diferentes formulaciones de PRP según la presencia o ausencia de leucocitos: LP-PRP, P-PRP y LR-PRP (McCarrel, Minas et al. 2012, Dohan Ehrenfest, Andia et al. 2014, Rossi, Murray et al. 2019). Teniendo en cuenta esta clasificación, el protocolo de doble centrifugación utilizado por estos autores proporcionó un LP-PRP (Ferrari and Schwartz 2020). Todavía actualmente, la presencia o ausencia de WBCs en el PRP se discute con frecuencia en la literatura. Los WBCs podrían ser una fuente adicional de FC y dotar de propiedades antimicrobianas (Castillo, Pouliot et al. 2011, Filardo, Kon et al. 2012) pero, por otro lado, los WBCs liberan citoquinas proinflamatorias que podrían provocar el proceso inflamatorio y contrarrestar el efecto positivo sobre la regeneración tisular (Castillo, Pouliot et al. 2011, McCarrel, Minas et al. 2012). Nuestro estudio no evaluó la eficacia clínica de los productos PRGF® obtenidos y se desconoce si estos productos con concentración moderada de PLTs, pero RBCs y WBCs indetectables tendrían aplicaciones in vivo. La versatilidad y biocompatibilidad de estos productos han estimulado su uso terapéutico en numerosos campos médicos y científicos, incluyendo odontología, implantología oral, ortopedia, tratamiento de úlceras e ingeniería de tejidos, entre otros. El uso de este hemoderivado rico en FC revela resultados prometedores como tratamiento de la osteoartritis en perros (Vilar, Morales et al. 2013, Cuervo, Rubio et al. 2014) y conejos (Torres-Torrillas, Damiá et al. 2021, Torres-Torrillas, Damiá et al. 2022), tendinopatías en caballos (Torricelli, Fini et al. 2011, Geburek, Gaus et al. 2016, Romero, Barrachina et al. 2017) y ovejas (Fernández-Sarmiento, Domínguez et al. 2013), cicatrización de heridas en conejos (Chicharro, Carrillo et al. 2018,

Chicharro-Alcántara, Rubio-Zaragoza et al. 2018) o cicatrización de úlceras corneales en diferentes especies (Rushton, Kammergruber et al. 2018, Farghali, AbdElKader et al. 2021). Los gatos son susceptibles a diversas enfermedades musculoesqueléticas y también pueden sufrir daños traumáticos (Chandler and Beale 2002), además, en los últimos años se han identificado más enfermedades ortopédicas en los gatos, especialmente osteoartritis (Chun, Canapp et al. 2020). Es razonable suponer que la terapia PRGF® podría ser efectiva para pacientes felinos de manera similar a lo que ocurre en otras especies animales pudiendo ser una buena opción terapéutica para el tratamiento de la osteoartritis, la cicatrización de heridas y las tendinopatías.

Actualmente los estudios de aplicación in vivo de PRP en diferentes patologías en gatos está aumentando, aunque todavía son muy escasos.

La publicación acerca de la aplicación clínica de PRP en los felinos más antigua data del año 2017. Gemignani y colaboradores, fueron pioneros en la aplicación clínica de este hemoderivado en el gato, apostaron por la aplicación de PRP heterólogo para la cicatrización de una herida ocasionada por mordedura de perro a un gato adulto joven FIV-FelV negativo. La herida, de dos días de evolución, se encontraba en la región del cuello y fue clasificada como herida contaminada. Después de valorar el caso, optaron por la aplicación tópica de PRP de un perro donante obtenido mediante el método tubo descrito por Perazzi y colaboradores (Perazzi, Busetto et al. 2013). Previa a la aplicación confirmaron mediante conteo celular que la muestra a aplicar contenía un rango óptimo de PLTs para considerarlo PRP. Posteriormente, la herida fue cubierta con un apósito para mantener el lecho húmedo y evitar exposición a microorganismos, que se retiraba cada dos días para eliminar los apósitos sucios y evaluar la evolución de la herida. El paciente no recibió tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), pero sí amoxicilina potenciada con ácido clavulánico como terapia antimicrobiana. En la descripción del caso clínico descrito no referencian más de una aplicación de PRP en el proceso de curación de la herida ni otros tratamientos cicatrizantes. El progreso de la herida se evaluó según el área total y los porcentajes de contracción y de epitelización de esta según Bohling y colaboradores (Bohling, Henderson et al. 2004). La aplicación de PRP en este caso consiguió cambios favorables desde los dos primeros días tras su aplicación, con una cicatrización completa de la herida a los 20 días (Gemignani, Perazzi et al. 2017). Este ha sido el único artículo acerca del uso de PRP heterólogo en gatos que se ha publicado hasta el momento. No obstante, aunque no fueron evidenciados efectos secundarios en el paciente descrito anteriormente por el uso de PRP heterólogo, una de las ventajas que ofrece y defiende PRGF®-ENDORET® es su seguridad por ser puramente autólogo. Coincidiendo con Gemignani y colaboradores, el tamaño de los gatos podría ser un inconveniente

dependiendo del volumen necesario de PRP a aplicar, sin embargo, la tecnología PRGF® dispone de tubos de extracción de 8 mL, un volumen asequible para casi cualquier gato adulto.

El primer estudio acerca de la aplicación clínica de PRP autólogo en gatos se publicó en 2021 por Farghali y colaboradores. Los autores evaluaron el efecto de inyectar PRP autólogo subconjuntival en el tratamiento de diferentes tipos de úlceras corneales en perros y gatos. Las úlceras corneales se definen como un defecto en el epitelio con pérdida del estroma que puede ir acompañado de inflamación (Acosta, Castro et al. 2014). Un total de 16 gatos fueron evaluados en el estudio, donde la raza persa y las hembras fueron las más afectadas por úlceras corneales, además, uno de los principales factores desencadenantes de las úlceras fue el herpesvirus felino (FHV-1). Los autores obtuvieron PRP siguiendo un protocolo de doble centrifugación descrito previamente por Kececi y colaboradores (Kececi, Ozsu et al. 2014). Siguiendo el protocolo descrito, se sometió a las muestras de sangre (tubos de 9 mL con citrato de sodio al 3,8%) a una primera centrifugación suave a 250 g durante 10 minutos para, posteriormente, pipetear la fracción del plasma superior (PPP) y la intermedia (PRP y WBCs) y seguidamente centrifugarlas aumentando la fuerza de centrifugación a 2000 g durante 10 minutos. Una vez obtenido el PRP, éste fue activado con cloruro cálcico e incubado a 37°C durante una hora antes de aplicarlo. Finalmente, para recuperar el PRP activado debió someterse a una tercera centrifugación de 3000 g durante 20 minutos para poder administrarlo vía subconjuntival. Lo que observaron en el estudio fue que la administración de PRP ayudó en la cicatrización de las úlceras tanto en perros como en gatos, sin embargo, el número de inyecciones necesarias hasta la curación total varió según paciente y tipo de úlcera. En general, los gatos necesitaron un mayor número de inyecciones que los perros (3 y 2 inyecciones, respectivamente) (Farghali, AbdElKader et al. 2021). Aunque los resultados del estudio fueron prometedores en el tratamiento de úlceras corneales, cabe destacar que el protocolo de obtención de PRP fue el mismo para perros que para gatos y que el protocolo original estaba descrito en humana. Además, en ningún momento el estudio detalla el conteo celular de la fracción plasmática considerada como PRP. En la mayoría de las especies animales, incluida la humana, el tamaño plaquetar puede oscilar de 2 a 4 milímetros (mm), pero en los gatos la variación entre PLTs puede variar de 2 hasta 6 mm. De hecho, las macroplaquetas presentes en los gatos alcanzan el mismo tamaño que los RBCs (Boudreaux, Osborne et al. 2010), por lo que este factor puede interferir con la concentración plaquetar en el PRP para esta especie, ya que la diferenciación de las distintas capas obtenidas tras la centrifugación de la sangre (RBC, *buffy coat* y fracción plasmática) se debe a diferencias en la densidad de las diferentes células sanguíneas, siendo los RBCs las primeras células en precipitar al final del tubo. Por ello, cabe pensar que los gatos con un tamaño de PLTs más grande podrían no alcanzar el rango óptimo o esperado de

concentración plaquetar en la fracción plasmática determinada como PRP, motivo por el cual los autores consideran adecuado realizar un conteo celular previamente a la aplicación del PRP en esta especie.

Recientemente se han publicado dos estudios acerca de la aplicación clínica de PRP en gatos. De nuevo, estos dos estudios emplean sistemas de obtención de PRP no validados previamente en esta especie. Angelou y colaboradores evaluaron la respuesta de la inyección de PRP intralesional en la curación de heridas cutáneas en 8 gatos adultos FIV-FeLV negativos. Se prefirió la inyección única intralesional en lugar de la aplicación diaria de solución PRP en gel porque la aplicación local puede dar lugar a la producción de líquido de origen inflamatorio y retrasar la contracción de la herida, además de afectar su absorción con el cambio de vendaje (Dionyssiou, Demiri et al. 2013). Para la obtención de PRP emplearon un kit comercial validado en humanos previamente, para ello extrajeron de cada paciente 11 mL de sangre que fueron introducidos en un tubo con gel de separación y anticoagulante ácido citrato dextrosa (MACD7) para posteriormente centrifugarla durante 10 minutos a 1.500 rpm obteniendo un total de 7 mL de plasma de los cuales 4 mL fueron considerados como PRP. Se crearon 6 heridas (3 de ellas fueron elegidas aleatoriamente como grupo control y las otras 3 para aplicación de PRP) con un bisturí incluyendo el músculo panicular y el tejido subcutáneo separadas 3 cm entre ellas (3 heridas a cada lado del dorso del paciente). Se inyectó un total de 1 mL de PRP en cada herida, aplicado en las esquinas de ésta. La evolución de las heridas fue evaluada macroscópicamente por foto planimetría y mediante flujometría láser Doppler e histología a diferentes tiempos. Los pacientes recibieron buprenorfina como tratamiento analgésico posoperativo y las heridas fueron vendadas. Los autores analizaron el PRP obtenido y este fue administrado en la primera hora tras su obtención. El incremento de PLTs en la fracción PRP fue de 2 a 8,2 veces el rango basal sin RBCs y unos niveles de WBCs de $0,73 \pm 0,4$ K/L, unos resultados similares a los proporcionados por el fabricante del kit. Los autores del estudio no hallaron diferencias significativas en la aparición de tejido de granulación entre las heridas tratadas con PRP y las heridas del grupo control, además, el tiempo de aparición de este tejido de granulación coincidió con lo previamente descrito (aproximadamente 6 días) en la bibliografía (Bohling, Henderson et al. 2004). No obstante, la cicatrización total de las heridas en el grupo PRP en comparación al grupo control fue casi el doble, concluyendo que la inyección intralesional de PRP mejora la cicatrización de heridas cutáneas en el gato (Angelou, Psalla et al. 2022).

Por otra parte, Farid y colaboradores determinaron el potencial del PRP como tratamiento en la esclerosis múltiple (EM) en gatos. La EM supone una enfermedad desmielinizante autoinmune

y progresiva del sistema nervioso central, sin una terapia eficaz hasta el momento. El estudio se desarrolló en gatos adultos de raza persa a los cuales se les provocó la EM en la zona toracolumbar (T12 – L2) empleando bromuro de etidio (BE), descrito previamente por Torres-Fuentes y colaboradores (Torre-Fuentes, Moreno-Jiménez et al. 2020). Los gatos fueron divididos en 3 grupos de 5 gatos cada uno. El grupo 1 se correspondía con el grupo control negativo, a los cuales no se les provocó lesión ni recibieron tratamiento ninguno. El grupo 2 o control positivo fue tratado con una inyección única de solución salina tamponada con fosfato (PBS) por vía intratecal en el agujero magno tras haber provocado la desmielinización con BE. Finalmente, los gatos del grupo 3 fueron sometidos a BE y posteriormente tratados con una inyección de 1 mL de PRP en solución PBS previamente activado con láser vía intratecal en el agujero magno. La administración de fármacos intratecal evita la barrera hematoencefálica, favoreciendo así su llegada hasta el sistema nervioso central (SNC). Para la obtención de PRP en este estudio, la sangre extraída de cada paciente fue sometida a una primera centrifugación de 3000 rpm durante 3 minutos que permitió separar la fracción plasmática y *buffy coat* de los RBCs y volver a centrifugar el plasma y WBCs para centrifugarlos a 4000 rpm durante 15 minutos. Se consideró como fracción PRP el tercio inferior de la muestra obtenida. Los resultados obtenidos indicaron que la administración de PRP puede mejorar significativamente la recuperación de la marcha y actividad sensorial al mejorar la regeneración de los axones, promoviendo la remielinización, inhibiendo la apoptosis y mejorando la angiogénesis. Así pues, el PRP puede tener efectos neuroprotectores en gatos (Farid, Abouelela et al. 2022). Conviene subrayar que la fuerza centrífuga relativa depende de las rpm y del radio del rotor de la centrífuga empleada, por lo que un protocolo bien descrito deberá siempre indicar las g empleadas y no rpm porque el tamaño de los rotores difiere entre centrífugas y, por tanto, a su vez la g será diferente. De este modo los autores desconocen si el protocolo empleado por Farid y colaboradores es extrapolable al sistema en el que se basaron descrito previamente por Giraldo y colaboradores (Giraldo, Álvarez et al. 2015). Además, los autores tampoco comprobaron la pureza del plasma obtenido, asumiendo que aplicaron PRP. En nuestro estudio, pudimos demostrar la oscilación en el porcentaje de PLTs obtenido según protocolo empleado además de la variabilidad individual que existe y la falta de reproducibilidad de protocolos para especies diferentes. Coincidiendo con publicaciones previas, consideramos esencial evaluar las características del PRP obtenido antes de su aplicación debido a las diferencias entre los sistemas comerciales disponibles en el mercado (Franklin, Garner et al. 2015, Ferrari and Schwartz 2020).

Actualmente, en medicina veterinaria no existe una concentración óptima de PLTs defendida por la bibliografía, lo que hace necesario ampliar las investigaciones en este campo (Chun, Canapp

et al. 2020). Además, los autores consideran interesante evaluar la respuesta del PRP obtenido con un mismo método en diferentes patologías o tejidos, ya que el porcentaje de PLTs requerido puede ser diferente según el tejido a tratar (Weibrich, Kleis et al. 2002).

Agregación plaquetar y VPM

La elevada prevalencia de agregados plaquetares en las muestras sanguíneas en gatos es un fenómeno que se conoce desde hace décadas y es el responsable de que el conteo de PLTs mediante métodos automáticos no sea siempre preciso. Según bibliografía contrastada, la prevalencia de estos agregados oscila entre un 40% y un 70% (Moritz and Hoffmann 1997, Zelmanovic and Hetherington 1998, Norman, Barron et al. 2001, Ellis, Bell et al. 2018, Ferrari and Schwartz 2020). En nuestro estudio se obtuvo un porcentaje menor (27%) de agregados plaquetares en las muestras de sangre basal con respecto a la bibliografía publicada. El factor delimitante en la agregación plaquetaria en esta especie no se conoce con exactitud, postulando diversas teorías como factores propios de la especie, el método y calidad de recolección de la sangre, el anticoagulante empleado en la muestra o el tiempo transcurrido hasta analizar la muestra sanguínea (Riond, Waßmuth et al. 2015, Ferrari and Schwartz 2020).

En nuestro proyecto, la recolección de las muestras de sangre basal mediante goteo a través de cateterización de la vena cefálica con catéter 22G, fue diferente al sistema de recolección de las muestras de sangre yugular mediante sistema vacutainer 22G de citrato de sodio al 3,8% para su centrifugación y obtención de PRP. Este hecho podría haber influido también en la formación de agregados plaquetares. Hasta hace aproximadamente 10 años, la calidad de la obtención de la sangre en gatos se había considerado una de las principales causas de agregación plaquetaria. Sin embargo, Riond B. y colaboradores estudiaron el comportamiento de las PLTs de los gatos tras la recolección sanguínea en EDTA en un tiempo transcurrido de 24 horas. Además, estudiaron la relación entre la calidad de extracción de la sangre y la presencia de agregados plaquetares. La presencia de estos agregados estuvo presente en el 57% de las muestras a diferentes tiempos, no obstante, demostraron que la separación plaquetar una vez formados los agregados fue posible, ya que, transcurridas 24 horas tras la recolección de la sangre, los agregados habían desaparecido en el 100% de las muestras. Al activarse, las PLTs se desgranulan y vierten al medio proteínas y citoquinas, esto les permite formar y mantener agregados plaquetares. Los autores del estudio sugieren que la desagregación plaquetaria podría estar relacionado con los niveles de glucosa presente en las muestras, ya que observaron una mayor palidez en las PLTs que se encontraban formando agregados en comparación a las PLTs solitarias. Las PLTs son capaces de absorber

glucosa de la sangre a través de transportadores de membrana de glucosa, de este modo obtienen la energía necesaria para activarse, romper sus gránulos y formar y mantener los agregados plaquetares. Por lo tanto, se puede teorizar que la desagregación podría ocurrir debido a una deficiencia de energía intracelular en PLTs desgranuladas. Otro dato destacable en esta publicación fue que la calidad en la extracción de la sangre no estaba correlacionada con la formación de los agregados plaquetares (Riond, Waßmuth et al. 2015). Teniendo en cuenta esta desagregación plaquetaria, en nuestro estudio, podría haber resultado útil analizar las muestras transcurridas 24 horas para obtener el conteo de PLTs sin agregados. No obstante, teniendo en cuenta que uno de los objetivos de nuestro trabajo es comparar la concentración celular de las muestras de sangre basal, PRP y PPP y que esta información solo se encuentra contrastada previamente en el análisis de las PLTs en muestras recogidas en EDTA, no sería extrapolable al análisis de otras células como WBCs o RBCs ni extrapolable a muestras con citrato como son las muestras recogidas con el kit PRGF®-Endoret®.

Aunque el índice de agregados plaquetares en muestras basales en nuestro estudio ha sido inferior a estudios previamente publicados (Norman, Barron et al. 2001, Ellis, Bell et al. 2018, Ferrari and Schwartz 2020), EDTA podría no ser el anticoagulante de elección en gatos. Tvedten y colaboradores compararon la efectividad que tenía añadir iloprost o PGE1 a las muestras sanguíneas recogidas en EDTA en la reducción de la formación de agregados plaquetares. El estudio realizado en 35 gatos demostró que la adición de estos antiagregantes, especialmente iloprost, disminuyó la presencia de agregados plaquetares en las muestras de EDTA, pero de ningún modo evitó la formación de estos en el 100% de las muestras analizadas. Además, demostraron que las muestras detectadas con agregados plaquetares por el analizador ADVIA se correspondían con pseudotrombocitopenia al comprobar la agregación plaquetar en frotis sanguíneo demostrando una vez más, que el frotis sanguíneo es el método más sensible para la detección de pseudotrombocitopenia en el gato (Tvedten, Ljusner et al. 2013).

Por otro lado, la diferencia en la *g* o modificación en el tiempo de centrifugación utilizados en la técnica de obtención de PRP darán lugar a diferencias significativas en los rendimientos, la concentración, la pureza, la viabilidad y el estado de activación de las PLTs aisladas (Fadadu, Mazzola et al. 2019). El hecho de haber aplicado centrifugación en las muestras podría ser responsable de las variaciones en los porcentajes de agregados plaquetares obtenidos en nuestro estudio, ya que, tanto en gatos sanos como en leucemia e inmunodeficiencia positivos, el número de agregados plaquetares fue superior en las muestras basales (27%, 18% y 50%, respectivamente) en comparación a la fracción plasmática PRP (7%, 18% y 25%, respectivamente).

Los agregados plaquetares en la fracción PPP fue de un 7% en gatos sanos y un 18% en gatos FELV. En gatos FIV no hubo agregación plaquetar en la fracción PPP.

En comparación con publicaciones previas (Silva, Alvarez et al. 2012) en los que el VPM fue menor en las muestras analizadas de sangre basal en comparación con los concentrados plaquetares, nuestro estudio reveló un VPM significativamente superior en muestras basales contrastado con las fracciones plasmáticas PPP y PRP independientemente del protocolo de centrifugación empleado y correlacionado positivamente con la presencia de agregados plaquetares. VPM es un parámetro asociado a la agregación plaquetar y diversos factores pueden influir en este valor, tales como el anticoagulante empleado en la muestra, el tiempo transcurrido hasta analizar la muestra o la propia metodología (Jackson and Carter 1993). La diferencia en el VPM podría deberse a los distintos anticoagulantes empleados, ya que EDTA puede provocar que las PLTs se hinchen. Esto podría explicar un mayor VPM en las muestras de sangre basal con respecto a las muestras obtenidas en citrato en nuestro estudio. El VPM en las fracciones plasmáticas de nuestro trabajo fueron comparables a las publicadas por Silva y colaboradores en los concentrados plaquetares que obtuvieron empleando ACD-A como anticoagulante (Silva, Alvarez et al. 2012).

Respecto al tamaño de las PLTs en gatos, este puede alcanzar valores superiores a 60 fL (Tvedten, Ljusner et al. 2013) y, aunque el analizador ADVIA es uno de los más fiables para el análisis de estas células en esta especie (Zelmanovic and Hetherington 1998), podría no detectar las PLTs de más de 60 fL dando lugar a valores inferiores en el porcentaje plaquetar.

Caracterización de factores de crecimiento: PDGF-BB y TGF- β 1

Los estudios acerca del análisis de los FC en gatos son muy escasos. Según bibliografía consultada, solo existe una publicación en la cual se comparó la concentración de FC como el PDGF-BB y TGF- β 1 entre plasma basal y concentrados plaquetares en esta especie (Silva, Alvarez et al. 2012). Nuestro trabajo obtuvo valores superiores de ambos FC en las fracciones PRP y PPP en comparación con las muestras de plasma basal analizadas por Silva y colaboradores empleando cualquiera de los 3 protocolos descritos. Sin embargo, estos valores fueron inferiores en comparación con los concentrados plaquetares para el mismo estudio.

La activación de las PLTs y liberación de FC depende de diversos factores. En el estudio de Silva y colaboradores los FC fueron analizados en plasma basal, que para su obtención aplicaron una centrifugación de la sangre de 1.500 g durante 15 minutos. No obstante, el análisis de los FC en

los PC-A y PC-B fueron activados según lote con gluconato cálcico al 10% o con trombina bovina y posteriormente incubados a 37 °C durante 3 y 6 horas tras su centrifugación, para finalmente ser analizados. No obtuvieron diferencias significativas para el tipo de activador empleado y observaron una mayor concentración de los FC analizados a las 3 h con respecto a las 6 h (Silva, Alvarez et al. 2012).

Otro estudio publicado acerca de la concentración de TGF- β 1 en 12 gatos sanos declara valores medios de 21.480 ± 8.948 pg/mL (Arata, Ohmi et al. 2005). Estos valores son superiores a los que obtuvimos en nuestro trabajo en las fracciones plasmáticas y superiores en comparación a los niveles basales de Silva y colaboradores, pero similares a los que obtuvieron en los concentrados plaquetares (Silva, Alvarez et al. 2012). Sin embargo, cabe señalar que las muestras analizadas por Arata y colaboradores fueron a partir de suero, esto podría haber influido en la concentración de TGF- β 1 por causar una activación temprana de las PLTs, ya que las muestras sanguíneas en suero se coagulan al no contener anticoagulante. Este coágulo de fibrinógeno y plaquetas requiere una activación plaquetaria para su formación con la consecuente liberación de los FC.

La diferencia en los niveles de PLTs entre individuos de una misma especie como puede observarse en nuestro estudio plantea que existan a su vez, diferencias en los niveles de FC basales individualmente. Se considera necesario ampliar las investigaciones acerca de la concentración de FC en el plasma basal en gatos.

Estudio 2: Evaluación del Plasma Rico en Plaquetas (PRGF®-Endoret®) en gatos con leucemia: Valoración de PDGF-BB y TGF- β 1.

FeLV es uno de los virus más prevalentes en gatos a nivel mundial y aunque su prevalencia y desarrollo han ido disminuyendo a lo largo de las últimas décadas debido, principalmente a un diagnóstico precoz y a programas de vacunación efectivos, la disminución de la prevalencia se ha estancado en algunos países. Como se ha comentado en la revisión bibliográfica de esta Tesis, existen cuatro posibles cursos de infección por FeLV determinado por la interacción entre el sistema inmune del gato y el propio virus: progresiva, regresiva, abortiva y atípica focal. Estas fases de la infección pueden determinarse con el uso consecutivo de diferentes pruebas diagnósticas. El impacto del virus en el gato infectado junto con los resultados en diferentes pruebas diagnósticas, plantean desafíos al veterinario en la toma de decisiones clínicas o pueden afectar al pronóstico del paciente. Además, el impacto de la infección regresiva por FeLV en el gato aún no se conoce con exactitud (Hartmann and Hofmann-Lehmann 2020).

Todos los gatos que participaron en este estudio se clasificaron como gatos FeLV positivo en fase progresiva de la enfermedad. El diagnóstico se realizó mediante dos inmunoanálisis, separados entre 6 y 9 meses, que permitieron detectar la presencia del antígeno p27 de FeLV. Se empleó el SNAP® FIV/FeLV Combo de Idexx con una sensibilidad del 100% y especificidad del 97,8%, siendo el valor predictivo positivo elevado para esta prueba (Krecic, Velineni et al. 2018).

Contrastando con la bibliografía publicada, no hemos observado diferencias significativas en la prevalencia de FeLV entre machos y hembras al igual que otros estudios (Lee, Levy et al. 2002). Sin embargo, otras publicaciones destacan un mayor índice de FeLV en gatos machos no esterilizados, probablemente debido al factor de la agresividad. Por tanto, las peleas y mordiscos entre gatos podrían tener mayor relevancia de lo que se ha documentado hasta el momento y no solo el contagio mediante lamidos y conducta amistosa (Goldkamp, Levy et al. 2008, Hofmann-Lehmann, Gönczi et al. 2018).

Concentración plaquetar

Según el conocimiento del autor, este es el primer trabajo publicado acerca de la obtención de PRP y análisis de FC en gatos naturalmente infectados de FeLV.

FeLV predispone a los gatos infectados a ciertas enfermedades e infecciones secundarias, siendo las heridas por mordedura o abscesos una de las principales complicaciones (Goldkamp, Levy et al. 2008). Se ha comentado anteriormente el papel que desempeñan las PLTs en la cicatrización de heridas y regeneración tisular, por ello, consideramos que este trabajo puede aportar nuevas estrategias en el tratamiento de patologías frecuentes en pacientes leucémicos.

En esta segunda parte del estudio, se aplicó el protocolo seleccionado de centrifugación con el que se halló la mayor concentración de PLTs obtenida, 265 g durante 10 minutos, a la sangre obtenida de los pacientes FeLV positivo. Tras la centrifugación, separación de las diferentes fracciones plasmáticas y análisis celular de las mismas, se obtuvo un enriquecimiento medio plaquetar del 143% (1,4 veces) en la fracción PRP con respecto a la sangre basal de los gatos. Estos resultados reflejaron datos muy similares a los obtenidos en pacientes sanos donde se obtuvo un enriquecimiento de PLTs del 147% (1,5 veces) con respecto a valores basales. En nuestro estudio, el rango de PLTs basales fue similar en gatos sanos ($328,5 \pm 155,8$ K/ μ L) y gatos FeLV ($307,3 \pm 106,2$ K/ μ L), no obstante, la presencia de este virus podría relacionarse con un menor número de PLTs (Ellis, Bell et al. 2018). Se ha visto que, la principal causa de trombocitopenia en gatos son las enfermedades víricas, siendo FeLV el agente causal principal (Ellis, Bell et al. 2018).

Es difícil estimar el porcentaje de PLTs obtenido según el protocolo de centrifugación o kit comercial empleado debido a la alta variabilidad individual. Hay solo dos publicaciones recientes que evalúan distintos kits comercializados para otras especies en gatos (Chun, Canapp et al. 2020, Ferrari and Schwartz 2020). Chun y colaboradores consiguieron un aumento de PLTs en la fracción PRP del 151% con respecto a la sangre basal a partir de una muestra de sangre de 12,5 mL con 2,5 mL de citrato dextrosa como anticoagulante, sometida a doble centrifugación, una primera a 3.600 rpm durante 1 minuto, que permitió separar la fracción plasmática y WBCs de los RBCs para, posteriormente volver a centrifugar la suspensión por encima de los RBCs a 3.800 rpm durante 5 minutos (Chun, Canapp et al. 2020). Este sistema se probó previamente en perros obteniendo un enriquecimiento plaquetar del 550% (Carr, Canapp et al. 2015). Por otra parte, Ferrari y colaboradores diseñaron un estudio para evaluar celularmente el PRP obtenido a partir de dos sistemas comerciales para perros, en gatos. Para no superar el 10% del volumen sanguíneo extraído en los gatos que participaron en el estudio, adaptaron el volumen según el sistema, siendo necesario disminuir los mL sanguíneos y, por tanto, los de anticoagulante en el segundo sistema. Para el primer sistema evaluado, fueron necesarios 13,5 mL de sangre centrifugada una única vez a 1.300 rpm durante 5 minutos. Por el contrario, el segundo sistema constaba de 2 centrifugaciones, una primera donde la sangre (12,5 mL) fue sometida a 3.600 rpm durante 1 minuto, permitiendo separar la fracción PPP y WBCs de los RBCs y centrifugarlos durante 5 minutos a 3.800 rpm. Con este protocolo consiguieron una concentración del 187%, sin embargo, no fue considerado como un PRP óptimo puesto que el fabricante recomendaba porcentaje de PLTs de 2 a 5 veces el valor basal (Ferrari and Schwartz 2020). Este sistema es el mismo kit empleado en el estudio de Chun y Colaboradores, lo que pone de manifiesto la variabilidad que existe para un mismo sistema comercial entre especies diferentes y dentro de la misma especie (Chun, Canapp et al. 2020).

Los estudios descritos anteriormente reflejan los protocolos empleados en rpm y no en g, esto no permite comparar adecuadamente los protocolos entre trabajos. La fuerza centrífuga relativa o g es la aceleración que se aplica a la muestra, es relativa a la fuerza de la gravedad de la Tierra y depende de las rpm y del radio del motor de la centrífuga empelada. Por tanto, un protocolo bien redactado deberá señalar las g empleadas en lugar de las rpm porque el tamaño de los rotores diferirá entre centrífugas y, por tanto, la fuerza g será distinta (Checas Rojas 2018).

El efecto del PRP sobre la regeneración tisular depende de variables como la concentración plaquetar obtenida, el volumen de PRP administrado, el tipo de lesión o tejido a tratar y de las condiciones del propio paciente (Alsosou and Harrison 2017). La concentración de PLTs óptima en

el PRP varía según publicaciones, sin embargo, Anitua y colaboradores recomiendan unos valores de PLTs justo por encima de 300.000 PLTs/ μ l (Anitua, Andia et al. 2004). Otro dato importante surge del estudio publicado por Choi y colaboradores donde observaron que concentraciones elevadas de PLTs tenían un efecto negativo sobre la regeneración tisular en comparación con porcentajes inferiores (Choi, Zhu et al. 2005). Destacando estos datos, el sistema 2 evaluado por Ferrari y colaboradores cumpliría un rango apropiado de PLTs.

Silva y colaboradores diseñaron un protocolo de centrifugación de 85 g durante 6 minutos, empleando para ello tubos de extracción de 8,5 mL con 1,5 mL de anticoagulante ACD-A. Las fracciones plasmáticas se dividieron equitativamente, clasificándose como PC-A (50% del plasma inferior, justo por encima del concentrado de RBCs) y PC-B (50% del plasma superior), posteriormente fueron activadas con gluconato cálcico e incubadas a 37 °C durante 3 y 6 horas para el análisis de los FC. En comparación a nuestro estudio, ellos obtuvieron un incremento de PLTs de 1,8 y 1,7 veces los valores basales para la fracción PC-A y PC-B, respectivamente, no obstante, debemos tener en cuenta que ellos emplearon estos protocolos exclusivamente en gatos sanos. Como puede observarse, la diferencia entre el concentrado plaquetar no es notable, por lo que se deberían plantear mayores estudios acerca de la separación de las fracciones plasmáticas. En nuestro estudio se ha seguido las indicaciones de BTI-Endoret® donde se considera fracción PRP el 40% de la fracción de plasma superior y, PPP el 60% del plasma inferior, justo localizado por encima del concentrado leucocitario. Si bien, nos gustaría puntualizar la necesidad de ampliar trabajos de investigación en el gato que pudieran establecer el porcentaje óptimo de plasma en cada fracción. La discrepancia observada entre sistemas en los diferentes trabajos pone de manifiesto la importancia de diseñar un protocolo de obtención de PRP específico para cada especie.

Pureza del PRP obtenido

Las investigaciones en el campo de la medicina regenerativa con el uso de PRP como terapia en diferentes especialidades ha aumentado en los últimos 50 años. Desde hace décadas, las terapias con PRP son opciones de tratamiento adecuadas con beneficio clínico en el paciente (Gentile and Garcovich 2020). Sin embargo, no existen regulaciones claras con respecto a la formulación y composición del PRP (Beitzel, Allen et al. 2015) y la composición de este hemoderivado varía notablemente de una formulación a otra en cuanto a porcentaje de PLTs, WBCs, RBCs y FC (Everts, van Zundert et al. 2008, Mazzucco, Balbo et al. 2012). La presencia de WBCs en la fracción plasmática sigue siendo tema de controversia en la bibliografía, ya que pueden provocar cambios

significativos en los tejidos. Algunos autores defienden la presencia de estas células, por lo que se han diseñado diferentes sistemas con la capacidad para concentrar poblaciones de las células blancas de forma heterogénea según prescripción (Melo, Luzo et al. 2019). Los NFS son células implicadas en la angiogénesis y restauración de los tejidos (Phillipson and Kubes 2019), aun así, pueden provocar efectos no deseables como aumento de la fibrosis, al estimular la proporción de colágeno tipo III con respecto al colágeno tipo I, así como liberar citocinas inflamatorias y metaloproteinasas de matriz promoviendo efectos proinflamatorios y catabólicos al aplicarse sobre los tejidos (Zhou and Wang 2016, Fedorova, Ksenofontov et al. 2018).

Silva y colaboradores con el protocolo de centrifugación establecido (85 g, 6 minutos) no consiguieron obtener un P-PRP, ya que la concentración de WBCs fue elevada en la fracción PC-A y PC-B ($5,19 \times 10^3/\mu\text{l}$ y $2,24 \times 10^3/\mu\text{l}$, respectivamente) y la contaminación con RBCs notable ($425 \times 10^3/\mu\text{l}$ y $323 \times 10^3/\mu\text{l}$, respectivamente) (Silva, Alvarez et al. 2012). Los RBCs administrados junto al PRP, al entrar en contacto con los tejidos liberan citoquinas que inhiben la migración de células madre y la proliferación de los fibroblastos causando una marcada inflamación (Repsold and Joubert 2018). Los autores Silva y colaboradores en su trabajo solo estudiaron concentraciones celulares plasmáticas, pero teniendo en cuenta la elevada contaminación en WBCs y RBCs debería cuestionarse su aplicación como opciones terapéuticas apropiadas.

Existen dos publicaciones acerca de la evaluación de un mismo sistema de obtención de PRP en perro aplicado en sangre felina, donde ninguno de los dos estudios consiguió eliminar la concentración de WBCs en la fracción PRP. Ferrari y colaboradores redujeron un 80% los WBCs de la fracción PRP con respecto a la basal (Ferrari and Schwartz 2020), mientras que Chun y colaboradores solo lograron disminuir el porcentaje de WBCs a un 36% (Chun, Canapp et al. 2020). Sin embargo, la población de los NFS en ambos trabajos se consiguió reducir notablemente, por debajo del 75%. La inclusión o no de los WBCs en los hemoderivados sanguíneos ya ha sido discutida anteriormente, cabe puntualizar que los NFS son la población de WBCs que mayor inflamación pueden producir en los tejidos (Zhou and Wang 2016), por lo que, en aquellos casos donde se requiera la aplicación de L-PRP, este sistema evaluado en gatos podría ofrecer una opción terapéutica al presentar un porcentaje leve de NFS. No obstante, nuestro estudio avala las condiciones de PRGF®-Endoret® libre de WBCs, garantizando el control de la inflamación sobre los tejidos.

Agregación plaquetar y VPM

La agregación plaquetar en gatos es un fenómeno frecuente que como consecuencia da lugar a un conteo erróneo de PLTs conocido como pseudotrombocitopenia (Moritz and Hoffmann 1997). En comparación con otros estudios publicados previamente, nuestro trabajo documentó pseudotrombocitopenia por agregados plaquetares en 4 muestras (36%) de sangre basal recolectada en EDTA. Los resultados obtenidos fueron superiores en comparación con la población de gatos sanos de este mismo trabajo (27%). Las PLTs presentan en su membrana glicoproteínas que actúan como receptores implicados principalmente en la hemostasia primaria: adhesión de las PLTs a componentes de la matriz extracelular de la pared vascular, agregación plaquetaria e interacción de las propias PLTs con otras células. Un estudio reveló diferencias entre las glicoproteínas de membrana plaquetar de gatos y humanos, donde estas proteínas tenían un mayor número de microvesículas positivas en los felinos, siendo probablemente el resultado de un aumento de la susceptibilidad a la activación de las PLTs en esta especie. Estas glicoproteínas se han visto implicadas en diversas enfermedades como la trombocitopenia inmunomediada, cardiopatías o uremia y, aunque se desconocen estudios acerca de la expresión de estas glicoproteínas en diferentes enfermedades en gatos (Tablin, Johnsrude et al. 2001), se considera interesante el desarrollo de futuros trabajos que evalúen si la presencia de FeLV podría verse implicada en la alteración de las glicoproteínas transmembrana afectando a la formación de agregados plaquetares.

Otros factores que se asocian con la agregación plaquetaria son la concentración de serotonina o ADP en gatos (Russel 2010), pero no se han encontrado publicaciones que evalúen estos factores en gatos con FeLV al respecto.

Con relación a la calidad en la recolección de la muestra, hay autores que creen que podría verse relacionada con la presencia de agregados plaquetares. El daño que se produce al incidir con una aguja en el vaso para la recolección de las muestras sanguíneas provoca la adhesión plaquetaria a través del FvW por glicoproteínas de membrana de las PLTs (Brooks and Catalfamo 2010). Sin embargo, autores como Riond y colaboradores no encontraron una concordancia entre estos factores (Riond, Waßmuth et al. 2015). Contrastando con bibliografía previa, donde se ha documentado agregación plaquetaria en porcentajes superiores (40-71%) (Zelmanovic and Hetherington 1998, Norman, Barron et al. 2001, Riond, Waßmuth et al. 2015, Ferrari and Schwartz 2020) y aun coincidiendo el calibre de la aguja (22G), consideramos que la recolección de nuestras muestras basales por sistema de goteo a través de cateterización cefálica podría verse implicado en la diferencia entre los porcentajes de agregados plaquetares en los gatos.

El tamaño plaquetar es uno de los factores implicados en la pseudotrombocitopenia en gatos, siendo en esta especie el VPM superior con respecto a otras especies. Por ejemplo, en el perro y en humana los valores de VPM son de 7 a 9 fL, mientras que en el gato el rango fisiológico de VPM alcanza los 11 fL (Boudreaux, Osborne et al. 2010). También se ha visto que existe una relación inversa entre el valor VPM y el conteo de PLTs, dando lugar a un mayor VPM en muestras con agregados PLTs (Zelmanovic and Hetherington 1998), incluso se ha llegado a documentar valores de VPM en gatos de 60 fL pudiendo no ser detectados por los analizadores automáticos (Tvedten, Ljusner et al. 2013).

El VPM en los gatos FeLV positivo de nuestro estudio tuvo un valor medio de $17,03 \pm 5,29$ fL (rango registrado por ADVIA 2120®: 8,6 - 18,9 fL) en sangre basal sin diferencias estadísticas con PRP y PPP ($14,1 \pm 3,6$ fL y $13,3 \pm 3,4$ fL, respectivamente). Este dato difiere de los valores VPM obtenido en gatos sanos de nuestro estudio, donde se registró un valor estadísticamente superior en este parámetro en las muestras basales ($16,3 \pm 5,0$ fL) con respecto a PRP y PPP ($12,3 \pm 2,5$ fL y $11,4 \pm 1,8$ fL, respectivamente). Esto podría estar relacionado con un mayor número de agregados plaquetares en gatos FeLV respecto a gatos sanos en nuestro estudio, ya que VPM es un indicador de agregación plaquetar (Vagdatli, Gounari et al. 2010). Resultados diferentes fueron obtenidos por Silva y colaboradores, donde las muestras de sangre basal reflejaron valores inferiores de VPM con respecto a los concentrados plaquetares, aunque siempre dentro del rango fisiológico (Silva, Alvarez et al. 2012).

Un VPM menor en nuestras muestras de PRP y PPP en comparación con la sangre basal podría indicar que la metodología PRGF®-Endoret® usada para obtener PRP en gatos no produce agregación plaquetar. Este concepto es importante, sobre todo para certificar la obtención de un hemoderivado rico en PLTs no activadas y, por tanto, garantizar la liberación de los FC al medio en el momento deseado tras su activación con cloruro cálcico según BTI-Endoret®.

Caracterización de factores de crecimiento: PDGF-BB y TGF-β1

Este trabajo supone el primer estudio acerca de la relevancia de FeLV en la calidad de concentrados plaquetares en gatos, así como las concentraciones de PDGF-BB y TGF-β1 determinadas según tecnología BTI®-Endoret®. Los valores medios de PDGF-BB resultaron inferiores en gatos positivos a leucemia en comparación con gatos sanos en la fracción PRP y PPP. Sin embargo, los valores de TGF-β1 obtenidos en el grupo FeLV fueron similares a los valores obtenidos en gatos sanos.

Comparar los resultados obtenidos para los valores de los FC analizados resulta complicado debido a la escasa bibliografía documentada. Solo existe una publicación en gatos sanos donde se estudió la concentración de PDGF-BB y TGF- β 1 en concentrados plaquetares y muestra basal (plasma) (Silva, Alvarez et al. 2012). Contrastando resultados, los gatos FeLV positivo en nuestro estudio referenciaron valores inferiores de PDGF-BB en PRP y PPP en comparación con los concentrados plaquetares y plasma basal de Silva y colaboradores. Sin embargo, los valores obtenidos de TGF- β 1 en la fracción PRP de nuestro trabajo fueron superiores con respecto a las muestras de concentrados plaquetares y plasma basal del estudio publicado con anterioridad.

Otros autores han destacado valores superiores de TGF- β 1 en muestras basales de gatos sanos comparado con los valores en PRP y PPP en nuestros gatos FeLV. No obstante, para poder comparar correctamente estos valores, ambas muestras deberían haberse obtenido a partir de plasma, ya que Arata y colaboradores analizaron este FC en muestras de suero, pudiendo verse afectado por la activación plaquetaria en la formación del coágulo por no contener anticoagulante en el tubo de suero (Arata, Ohmi et al. 2005).

Un estudio publicado en pacientes humanos con leucemia destacó valores inferiores de TGF- β 1 en comparación con pacientes sanos, además, una vez resuelta la leucemia, los niveles de TGF- β 1 volvieron a rangos fisiológicos y volvieron a disminuir en situación de recaída para la enfermedad (Wu, Chen et al. 2012). Aunque la leucemia en humanos no ocurre por un virus y es diferente a la leucemia en gatos, ambas tienen repercusión en las células hematopoyéticas, por tanto, sería interesante valorar la concentración de TGF- β 1 en las diferentes fases de FeLV y estudiar cómo este virus podría alterar la composición del PRP y calidad de los FC obtenidos en gatos FeLV positivo.

Estudio 3: Caracterización del PRP en gatos infectados por el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV): análisis celular y de los factores de crecimiento PDGF-BB y TGF- β 1.

La infección por FIV en gatos presenta una amplia distribución geográfica, que junto a FeLV es uno de los retrovirus con mayor impacto en la salud de la población felina. Existen al menos 5 subtipos bien determinados de FIV distribuidos mundialmente (A-E), siendo los subtipos A y B los más prevalentes y, específicamente en España, el subtipo B (Hosie, Addie et al. 2009). Parece haber diferencias específicas de subtipo en la enfermedad, por ejemplo, el subtipo A se ha visto mayormente implicado en el desarrollo de enfermedad neurológica asociada a FIV (de Rozieres, Thompson et al. 2008) en comparación con el subtipo B, que parece ser menos sintomático (Bachmann, Mathiason-Dubard et al. 1997). El análisis de FIV en los gatos de esta Tesis se llevó a cabo mediante la realización de un ELISA, método diagnóstico del virus indirecto que se basa en la detección de anticuerpos capaces de reconocer proteínas estructurales del virus, en particular la proteína p24 de la cápsula del virus y la glucoproteína gp41, por lo que se desconoce con exactitud el subtipo de FIV en cada gato, aunque contrastando información previamente

publicada se asume que el subtipo presente en España es el B, además todos nuestros gatos eran asintomáticos para FIV (Hosie, Addie et al. 2009).

La prevalencia de FIV en Europa representa datos de hasta el 30% (Carlton, Norris et al. 2022, Priolo, Masucci et al. 2022) y en España constituye entre el 1 y el 20,9% de la población de gatos (Ayllón, Diniz et al. 2012, Miró, Rupérez et al. 2014, Montoya, García et al. 2018, Alcover, Basurco et al. 2021, Candela, Fanelli et al. 2022, Villanueva-Saz, Giner et al. 2022).

Los gatos adultos enfermos con un sistema inmune debilitado, los gatos machos y los gatos de vida libre o acceso al exterior son los más susceptibles de infectarse con FIV, siendo la principal vía de contagio la saliva a través de mordiscos. Todos los gatos FIV positivos que participaron en nuestro estudio habían tenido acceso al exterior en algún momento de su vida y coincidiendo con publicaciones previas, observamos una mayor prevalencia en los machos (94%) con respecto a las hembras (6%).

Haciendo hincapié en la patogenia de este virus ya descrita previamente en la revisión bibliográfica, todos los gatos inmunodeficientes que participaron en este trabajo se encontraban en una fase progresiva de la enfermedad. Para ello, realizamos dos pruebas consecutivas con un intervalo de tiempo entre 6 y 9 meses empleando SNAP® Combo IDEXX, esta prueba capaz de detectar anticuerpos frente a las proteínas p24 y gp41 del virus tiene una sensibilidad del 98% y una especificidad del 99% en la detección de FIV (Little, Levy et al. 2020). Durante esta fase asintomática la carga viral permanece estable, pero existe una disminución progresiva de los linfocitos T CD4+ y, por tanto, conduce a una inmunodeficiencia funcional que evolucionará al desarrollo de un síndrome de inmunodeficiencia adquirida y muerte del paciente (Torten, Franchini et al. 1991). No obstante, los gatos infectados de FIV pueden vivir tanto tiempo como los gatos no infectados, aunque se ha demostrado que tienen mayor riesgo de desarrollar signos clínicos principalmente secundario a otras enfermedades como infecciones, enfermedades autoinmunes y neoplasias (Hosie, Robertson et al. 1989, Addie, Dennis et al. 2000), además se ha demostrado que la duración de la fase asintomática varía según la variante del virus (Pedersen, Leutenegger et al. 2001). No existe un tratamiento específico para FIV, la atención clínica de estos pacientes debe basarse en el tratamiento de enfermedades secundarias a la inmunosupresión desarrollada por FIV como infecciones y neoplasias (Little, Levy et al. 2020).

Sabiendo que la terapia con PRP ha demostrado eficacia en el tratamiento de múltiples enfermedades de carácter inflamatorio, el propósito de este trabajo ha sido la estandarización de un protocolo de obtención de PRP en el gato y ver si la presencia de FIV puede alterar la calidad

de este hemoderivado, pudiendo realizar estudios futuros como terapia en gatos con diferentes patologías asociadas a FIV.

Concentración plaquetar

Esta Tesis Doctoral describe por primera vez un protocolo manual de centrifugación simple (PRGF®-Endoret®) para obtener PRP de sangre felina, concentrando así los FC (TGF- β 1 y PDGF-BB) en gatos infectados naturalmente con FIV. La obtención de PRP se llevó a cabo aplicando el protocolo de centrifugación 265 g durante 10 minutos previamente estudiado en gatos sanos por ser el protocolo que en mayor medida cumplió con las características PRGF®-Endoret®.

Los resultados del presente estudio mostraron que el protocolo descrito en la fase de caracterización de éste en gatos sanos y, posteriormente reproducido en gatos FeLV positivo, no alcanzó valores óptimos de PLTs en gatos FIV positivo. Dado que la tecnología PRGF®-Endoret® considera producto PRP aquel que contenga un número de PLTs superior en al menos 1,5 veces las PLTs basales (Anitua, Sánchez et al. 2007), el concentrado obtenido en este trabajo en gatos con inmunodeficiencia de 1,1 sobre las PLTs basales, no se caracterizó como un PRP según la concentración plaquetar, aunque sí cumplió con las características de reducción extrema de RBCs y WBCs. Teniendo en cuenta que todos los gatos que participaron en esta fase fueron gatos FIV en fase progresiva de la enfermedad, se desconoce si el protocolo empleado podría ser reproducible en otras fases del virus como la aguda o la latente. No obstante, se considera necesario ampliar estos resultados con más estudios.

Las fases previas de esta Tesis reportan concentrados plaquetares de 1,5 en gatos sanos y 1,4 en gatos FeLV positivo. Dado que se utilizó la misma tecnología, las diferencias en el grado de enriquecimiento de PLTs, en principio, no deberían relacionarse con la metodología, sino con características propias del virus.

Uno de los mayores obstáculos que surgen a la hora de evaluar hemoderivados ricos en PLTs es la amplia gama de productos que el mercado ofrece para su obtención, con declaraciones en el enriquecimiento de PLTs y otras células como WBCs y RBCs diversas (Everts, Onishi et al. 2020). Además, se ha podido demostrar que cada protocolo de centrifugación no es reproducible para especies diferentes en la mayoría de las situaciones, incluso existe variabilidad individual. En algunos estudios que evalúan diferentes kits comerciales o métodos de obtención de concentrados plaquetares en gatos se obtuvo PRP con diferente composición en comparación a otras especies. Estos autores concluyeron que es necesaria la estandarización de un protocolo de

centrifugación según especie, así como que se requieren más investigaciones para determinar las concentraciones ideales de PLTs, RBCs y WBCs para conseguir un efecto terapéutico en esta especie, así como son necesarias también para conocer cuáles serían las concentraciones ideales según la patología tratada (Chun, Canapp et al. 2020, Ferrari and Schwartz 2020). Chun y colaboradores evaluaron en gatos sanos un sistema comercial descrito en perros de doble centrifugación con el que consiguieron obtener una concentración plaquetar moderada (151%) con respecto a la sangre basal con una reducción notable de RBCs (95%), sin embargo, no consiguieron eliminar la concentración de WBCs. Además, observaron una variabilidad individual notable, destacando que en algunos gatos la concentración plaquetar no fue posible. Por el contrario, la reducción de RBCs se comportó del mismo modo en todos los pacientes del estudio (Chun, Canapp et al. 2020). Ferrari y colaboradores comprobaron la concentración plaquetar en gatos empleando el mismo sistema que el estudio anteriormente descrito, consiguiendo una concentración de PLTs algo superior (187%) sin presencia de RBCs y con una disminución de WBCs del 80% con respecto a la sangre basal, los autores destacaron que el producto obtenido debería clasificarse como L-PRP (Ferrari and Schwartz 2020). Este dato pone de manifiesto que no solo puede existir variabilidad entre un mismo kit comercial dentro de una misma especie en la concentración plaquetar sino también en la reducción de los WBCs. Ferrari y colaboradores compararon otro sistema comercial descrito previamente en perros, en gatos. A diferencia del primer sistema, este dispositivo requería de una centrifugación simple, no obstante, en este caso la reducción de RBCs y WBCs fue del 100% y las PLTs disminuyeron un 3% con respecto a la sangre basal. Esta diferencia entre sistemas pone de manifiesto la posibilidad de que, por las características de la sangre felina, el segundo paso de centrifugación sea importante para la concentración de las PLTs o, por el contrario, que la configuración de la centrífuga deba modificarse según especie. Al no haber evaluado la eficacia clínica de los productos obtenidos, se desconoce si los productos PRP logrados que tenían concentraciones de PLTs similares a las muestras basales con una concentración de RBCs y WBCs significativamente reducida, tendría aplicaciones in vivo (Ferrari and Schwartz 2020). Coincidiendo con publicaciones previas, la reducción casi en su totalidad de RBCs (99%) fue posible en todos los gatos FIV de este trabajo y la disminución en los WBCs fue notable en todos los pacientes (95%). Del mismo modo que Ferrari y colaboradores concluyeron que se requería de estudios in vivo, consideramos que la aplicación del producto obtenido en este trabajo libre de RBCs y WBCs podría tener beneficio clínico según patología aún con un rango de PLTs 1,1 veces la muestra basal.

Autores como Anitua y colaboradores 2004, pionero en la tecnología PRGF defienden como producto PRP aquel concentrado con un número de PLTs superior a 300.000 PLTs/ μ L (Anitua,

Andia et al. 2004) y, aunque el protocolo establecido en gatos FIV no consiguió una concentración de PLTs superior a 1,5 veces la concentración basal, se registraron en todos los gatos valores medios de PLTs de $359,3 \pm 90,6$ K/ μ L en la fracción PRP, libre de RBCs y WBCs, por lo que podría catalogarse como un hemoderivado rico en PLTs.

Agregación plaquetar y VPM

Una de las principales causas de trombocitopenia en el gato son las enfermedades infecciosas, especialmente aquellas ocasionadas por retrovirus como FeLV y FIV. Un estudio publicado en Reino Unido evaluó las causas de trombocitopenia en 194 gatos, destacando como principales motivos las enfermedades hematológicas (15%) y enfermedades infecciosas (15%), seguido de neoplasias (13%), donde tan solo un 3% de los gatos trombocitopénicos por causa infecciosa fueron FIV positivos (Ellis, Bell et al. 2018). Estudios más antiguos revelan prevalencia de gatos FIV trombocitopénicos del 6 al 16% (Shelton, Waltier et al. 1989, Yamamoto, Hansen et al. 1989, Hart and Nolte 1994). No obstante, la pseudotrombocitopenia asociada a la agregación plaquetaria es una manifestación mucho más común en gatos en comparación a otras especies dando lugar a un recuento erróneo en el conteo de las PLTs, por lo que uno de los métodos más fiables y aceptados para el recuento de estas células en gatos es siempre el conteo manual mediante frotis sanguíneo (Riond, Waßmuth et al. 2015). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, las muestras basales analizadas en gatos FIV positivos reflejaron una agregación plaquetaria del 50%. Comparando nuestros resultados con estudios previamente publicados en gatos, podríamos afirmar que la formación de agregados plaquetares se comporta siguiendo el estándar para esta especie, ya que la bibliografía refleja datos de pseudotrombocitopenia del 36% al 72% (Moritz and Hoffmann 1997, Zelmanovic and Hetherington 1998, Norman, Barron et al. 2001). Todo esto nos hace pensar que la presencia del virus no predispone directamente a la formación de estos agregados, aunque contrastando con los resultados obtenidos en este trabajo en el grupo de gatos sanos donde el porcentaje de agregados plaquetares fue del 27% y en gatos FeLV positivos del 36% para sangre basal, los resultados fueron superiores en el grupo FIV positivo. Cabe destacar que el porcentaje de agregación plaquetar en las muestras PRP de los gatos FIV fue de un 25% y nulo en las muestras PPP. Comparando los resultados con las muestras basales, donde la activación de las PLTs y, por tanto, formación de agregados, fue del doble, puede afirmarse que la centrifugación según la tecnología BTI-Endoret® no aumenta la formación de agregados plaquetares, por lo que la liberación de FC al medio no se vería repercutida.

El factor anticoagulante de la muestra es otro factor para tener en cuenta en la formación de agregación plaquetar. Como se ha comentado anteriormente, un estudio publicado por Tvedten y colaboradores demostró una reducción de estos agregados añadiendo iloprost o PGE1 a las muestras con EDTA, aunque no pudo evitar la agregación de las PLTs en el 100% de las muestras (Tvedten, Ljusner et al. 2013). Los autores, consideran interesante este dato y podría emplearse para futuros estudios en gatos FIV positivo.

La adhesión entre plaquetas es un fenómeno fisiológico de la hemostasia primaria y como ya se ha comentado con anterioridad en esta Tesis Doctoral, un factor responsable de una mayor reactividad de las PLTs felinas podría ser la presencia de glicoproteínas de membrana plaquetar con un mayor número de microvesículas positivas en comparación a otras especies como perros y humanos. Al mismo tiempo, ciertas enfermedades como trombocitopenia inmunomediada, cardiopatías o uremia se han relacionado con la actividad de estas glicoproteínas de membrana (Tablin, Johnsrude et al. 2001). Así bien, faltan estudios acerca de la expresión de estas proteínas de membrana en gatos con diferentes enfermedades, consideramos por ello interesante estudiar si los gatos FIV positivo podrían presentar particularidades en las glicoproteínas de membrana plaquetar que pudieran ser responsables de la formación de agregados.

Como se ha expuesto previamente, la formación de agregados plaquetares en gatos se ha relacionado con diferentes causas, como un tamaño plaquetar elevado, una mayor concentración de serotonina o niveles inferiores de ADP, entre otros (Riond, Waßmuth et al. 2015). Por otro lado, aunque los trastornos hemostáticos en gatos FIV positivo son raros (Hart and Nolte 1994), es posible que las PLTs en estos gatos tengan características propias, sean más reactivas o frágiles y no resistan los protocolos de centrifugación y, de esta forma se vean afectados los niveles de FC en las muestras. Los autores no han encontrado bibliografía documentada acerca de cómo la presencia de FIV en los gatos podría relacionarse con estos factores, considerando interesante la realización de mayores estudios con relación a la formación de agregados plaquetares en gatos FIV positivo.

El VPM estándar en gatos es muy variable, el rango registrado por ADVIA 2120® es de 8,6 - 18,9 fL. Sin embargo, se han registrado valores de hasta 60 fL (Tvedten, Ljusner et al. 2013). Por ello, a menudo se superpone con el tamaño de los RBCs dando como resultado contajes erróneos. Por otro lado, la presencia de agregados plaquetares puede resultar en un contaje falso de WBCs, esto ocurre especialmente cuando se emplea maquinaria basada en impedancia (Knoll and Rowell 1996). Analizando los resultados de esta Tesis, en el grupo de gatos FIV positivo los valores medios de VPM en muestras de sangre basal fueron superiores ($18,6 \pm 3,1$ fL) con respecto a gatos sanos

($16,3 \pm 5$ fL) y gatos FeLV positivo ($17,03 \pm 5,29$ fL). No hay bibliografía documentada acerca del VPM en gatos con la presencia de FIV. Sin embargo, habiendo obtenido un porcentaje superior de agregados en muestras basales en este grupo de gatos, podría ser la causa de un mayor valor VPM en sangre basal.

Caracterización de factores de crecimiento: PDGF-BB y TGF- β 1

Comparando los valores obtenidos en los tres estudios, la concentración de FC en gatos FIV fue menor comparado con gatos sanos y gatos FeLV. Este dato es esperable, ya que los FC se encuentran en el interior de los gránulos alfa de las PLTs (Everts, Onishi et al. 2020). La concentración de PLTs en gatos con inmunodeficiencia fue de 1,1 sobre el valor basal, mientras que en gatos sanos fue de 1,5 y en gatos FeLV de 1,4. Sin embargo, la concentración de ambos FC fue superior en las muestras con agregados plaquetares con respecto a las que no presentaron agregados. Contrastando con los resultados obtenidos en gatos sanos y gatos FeLV, la presencia de agregados plaquetares no afectó a la concentración de PDGF-BB y TGF- β 1 en estos grupos de gatos. La concentración de FC inferior en el grupo FIV podría relacionarse con la pseudotrombocitopenia, que fue superior en los gatos FIV con respecto a los gatos sanos y leucémicos, ya que la activación de las plaquetas al agregarse hace que se liberen FC. Teniendo en cuenta este resultado, las muestras de PRP que presentaran agregados plaquetares podrían aun así tener beneficio clínico en los pacientes. Si bien, se deben ampliar los estudios.

Conclusiones

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Conclusiones

En base a los objetivos fijados al inicio de la presente Tesis Doctoral y teniendo en cuenta las condiciones del estudio, se enumeran las conclusiones derivadas tras el análisis y discusión de los resultados obtenidos:

- **Primera:** La aplicación de una velocidad de centrifugación de 265 g durante 10 minutos es el mejor protocolo de los evaluados. Permite obtener un hemoderivado que cumple con los estándares de la metodología PRGF®-Endoret® en gatos sanos (esto es, 1,5-2,5 veces la concentración basal de PLTs en sangre y ausencia de RBCs y WBCs).
- **Segunda:** El empleo de la metodología PRGF®-Endoret®, según el protocolo estandarizado en gatos: 265 g durante 10 minutos, logró obtener y diferenciar las fracciones PRP y PPP en gatos FeLV positivo. El enriquecimiento moderado de PLTs y la reducción absoluta de RBCs y WBCs en las muestras obtenidas permiten clasificar a este producto como P-PRP. No obstante, aunque la concentración mínima de PLTs

según los estándares PRGF®-Endoret® no se alcanzó, fueron muy similares a los obtenidos en gatos sanos. En consecuencia, la optimización y la estandarización del protocolo para el uso del PRGF podría ser utilizado terapéuticamente como una opción para paliar los efectos de enfermedades concomitantes en gatos leucémicos.

- **Tercera:** El protocolo estandarizado de obtención de PRGF®-Endoret® no fue reproducible en gatos infectados de inmunodeficiencia felina. Este resultado podría estar relacionado con un mayor número de muestras con agregados plaquetares en sangre basal en comparación a gatos sanos y leucemia. No obstante, la fracción plasmática obtenida podría categorizarse como un concentrado plaquetar al mostrarse libre de RBCs y WBCs y tener una concentración de PLTs de más de 300.000 PLTs/ μ L.
- **Cuarta:** La tecnología PRGF®-Endoret® ha conseguido obtener concentraciones plasmáticas para los FC PDGF-BB y TGF- β 1. Este estudio representa el primer trabajo acerca de las concentraciones plasmáticas de PDGF-BB y TGF- β 1 en gatos en fracciones plasmáticas en individuos sanos, FeLV y FIV positivos, considerándose un estudio pionero en el tema.
- **Quinta:** La escasa bibliografía documentada acerca de la estandarización y aplicación clínica del PRP en gatos, hace necesario ampliar con más estudios acerca del rango óptimo de PLTs y FC en esta especie para la obtención de un PRP con fines terapéuticos.

Limitaciones del estudio y futuras líneas de investigación

**Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)
en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con
Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)**

Limitaciones del estudio

Aplicando juicio crítico, es interesante revisar el diseño y la metodología empleada en esta Tesis Doctoral con el fin de identificar las posibles limitaciones. De esta forma, se puede llevar a cabo una interpretación más correcta de los resultados y plantear mejoras aplicables a futuros trabajos de investigación en esta línea, mejorando el impacto de estos.

Una de las principales limitaciones del investigador ha sido la falta de estudios previos en el tema. Como se ha mencionado con anterioridad, son muy escasas las publicaciones acerca del PRP en gatos, de la estandarización de protocolos para su obtención o aplicación clínica. Los estudios previos permiten fundamentar la relevancia de una investigación, por ello los autores de esta Tesis, consideran necesario ampliar con nuevos estudios acerca del PRP en esta especie.

Dado que existe una gran variabilidad interindividual en cuanto a la formación de agregación plaquetar, se podría pensar que este hecho puede ser motivo de las discrepancias observadas en los resultados de ensayos clínicos en gatos. Por lo tanto, hubiera sido interesante analizar diferencias bioquímicas entre las PLTs de los diferentes grupos de gatos. No obstante, concurre

una gran limitación general en la investigación acerca de la reactividad de las PLTs de esta especie animal.

Otra limitación es que solo se realizó el análisis de los FC en las fracciones PRP y PPP y no en plasma, por lo que hubiese sido interesante analizarlos en nuestro estudio para comprobar la correlación entre los niveles plasmáticos y séricos. Sin embargo, la aplicación de fuerza g en la centrifugación para la obtención de ese plasma podría repercutir sobre el valor basal de los FC.

Finalmente, también hubiese sido interesante incluir en el estudio el análisis de otros FC, ya que la composición de los gránulos alfa y las funciones de las PLTs no se limita únicamente a la implicación de PDGF-BB y TGF- β 1.

Futuras líneas de investigación

Finalizada esta Tesis Doctoral y después de analizar sus resultados y evaluar sus limitaciones, se plantean como futuras líneas de investigación:

En primer lugar, sería interesante ampliar los trabajos acerca de la estandarización del protocolo de obtención de PRP en gatos. Dado que se sabe que el kit empleado, la centrifuga y las propias características plaquetares de especie pueden modificar la pureza del PRP obtenido, sería útil llevar a cabo nuevos estudios acerca de la metodología de obtención y características celulares del hemoderivado variando los diferentes kits disponibles en el mercado.

Por otro lado, se conoce que la aplicación clínica de PRP ofrece grandes beneficios como terapia en el campo de la medicina regenerativa, garantizando resultados óptimos en la curación de heridas, control de la inflamación y propiedades antibacterianas. Por todo ello, una posible futura línea de trabajo sería la aplicación clínica de PRGF®-Endoret® en patologías como osteoartrosis y regeneración ósea, cicatrización de úlceras corneales o curación de heridas, entre otras como se aplicaba desde hace décadas en otras especies.

Por último, destacando las múltiples propiedades de las PLTs y la implicación de estas en la regeneración tisular y propiedades antiinflamatorias y, dado que nuestro trabajo indica que el protocolo establecido para la obtención de PRP en gatos sanos, gatos FeLV y gatos FIV garantiza un hemoderivado libre de RBCs y WBCs, sería interesante realizar estudios de aplicación clínica de este hemoderivado sanguíneo en las diferentes patologías que puedan padecer pacientes enfermos.

Resumen

**Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)
en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con
Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)**

Resumen

Desde hace más de cuatro décadas, el PRP ha demostrado poseer propiedades moduladoras y estimuladoras de la proliferación de las células derivadas de células madre de origen mesenquimal: fibroblastos, células endoteliales, miocitos, condrocitos y osteoblastos, entre otras. De este modo, resulta un elemento útil alternativo que promueve la regeneración tisular. Son los FC localizados en el interior de los gránulos alfa de las PLTs, los responsables de estos efectos que, tras la activación plaquetar, son liberados al medio influyendo en muchos aspectos de la cicatrización.

En medicina humana, son diversos los tipos de PRP que ofrece el mercado, sin embargo, todavía no existe un consenso que establezca una rigurosa clasificación, lo que genera discrepancia acerca de su composición. En el ámbito veterinario, este hemoderivado se emplea cada vez más con mayores garantías de éxito en el tratamiento, especialmente en el campo de la traumatología, oftalmología y curación de heridas. PRGF®-Endoret® es un tipo de P-PRP con las características de una concentración moderada de PLTs (1,5-2,5 el valor basal), libre de RBCs y WBCs, cuya obtención se obtiene a partir de una centrifugación simple. Son muchos los estudios en humana y en

veterinaria que avalan este producto como tratamiento en medicina regenerativa. No obstante, son muy pocos los estudios acerca de la obtención y aplicación clínica del PRP en gato.

Debido a que en la literatura existen diferentes protocolos para la obtención del concentrado plaquetario, de acuerdo con cada sistema e incluso cada autor, el principal objetivo de este trabajo fue estandarizar un protocolo de obtención de PRP en el gato, comparando para ello, la composición celular de las diferentes fracciones plasmáticas (PPP y PRP) con la sangre basal. También se evaluaron las concentraciones plasmáticas de FC como PDGF-BB y TGF- β 1. Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue estudiar cómo la presencia de enfermedades víricas comunes en los gatos como son la leucemia y la inmunodeficiencia felina podría afectar a la calidad en la obtención y composición de este hemoderivado. Para ello, la tesis doctoral se dividió en tres estudios experimentales comparativos y prospectivos:

El primer estudio se realizó en 30 gatos sanos (FeLV, FIV negativos y sin alteraciones analíticas previas). Para la estandarización del protocolo de centrifugación se extrajo a cada gato 3 tubos de 9 mL de sangre, que fueron aleatoriamente centrifugados según 3 protocolos diferentes: 255 g, 260 g y 265 g, siempre manteniendo el tiempo en 10 minutos. Se analizaron y compararon los diferentes componentes celulares: PLTs, VPM, RBCs, WBCs, LYMPH, NFS y MON entre las fracciones PRP, PPP y sangre basal. Además, se estudió la concentración de los FC, PDGF-BB y TGF- β 1, en las fracciones plasmáticas PPP y PRP.

Los resultados obtenidos en el primer estudio demostraron que la tecnología PRGF®-Endoret® permitió obtener una concentración de PLTs con respecto a la sangre basal, libre de células de la serie blanca y roja empleando cualquiera de los tres protocolos. Aunque no hubo diferencias significativas entre protocolos, la centrifugación a 265 g durante 10 minutos permitió obtener una concentración de 1,5 veces las PLTs basales. El VPM fue estadísticamente superior en sangre basal con respecto a las fracciones PPP y PRP sin diferencias significativas entre protocolos. Las concentraciones de PDGF-BB y TGF- β 1 fueron estadísticamente superiores en la fracción PRP con respecto a la fracción PPP sin diferencias entre protocolos, salvo empleando el protocolo 260 g donde la concentración de TGF- β 1 no tuvo diferencias significativas entre PPP y PRP.

Una vez estandarizado el protocolo de obtención de PRGF®-Endoret® en gatos sanos: 265 g durante 10 minutos, se aplicó a 11 gatos leucemia positivos (FeLV) y 16 gatos inmunodeficiencia positivos (FIV).

En primer lugar, el protocolo en el grupo de gatos FeLV consiguió concentrar las PLTs en la fracción PRP en 1,4 veces con respecto a la sangre basal, disminuyendo los valores de RBCs y WBCs en un 99% y 95%, respectivamente. El valor VPM no difirió significativamente entre las fracciones

plasmáticas y la sangre basal. La concentración del FC TGF- β 1 fue estadísticamente superior en la fracción PRP en comparación con la fracción PPP. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las fracciones plasmáticas para la concentración de PDGF-BB.

Por último, en gatos FIV, el protocolo de centrifugación establecido 265 g durante 10 minutos, obtuvo una concentración de PLTs significativamente superior en la fracción PRP con respecto a la fracción PPP. No obstante, la concentración plaquetar no difirió significativamente entre la sangre basal y la fracción PRP ni entre sangre basal y la fracción PPP. La concentración de PLTs en la fracción PRP fue de 1,1 con respecto a la sangre basal. La concentración de RBCs consiguió disminuirse en un 99% y el porcentaje de WBCs disminuyó en un 92% en las fracciones PRP y PPP respecto a la sangre basal. La concentración de TGF- β 1 fue estadísticamente superior en la fracción PRP respecto a PPP.

La tecnología PRGF®-Endoret®, empleando el protocolo de centrifugación 265 g durante 10 minutos, permitió la obtención de un producto clasificado como P-PRP en gatos sanos con un porcentaje moderado de PLTs. No obstante, y aunque la concentración plaquetar en la fracción PRP de gatos FeLV no llegó a alcanzar el mínimo estándar según PRGF®-Endoret®, los valores fueron muy similares respecto a gatos sanos. El protocolo estandarizado de nuestro trabajo no fue reproducible en gatos FIV. Se desconoce la fisiopatología que podría tener el virus de la inmunodeficiencia sobre la obtención de este hemoderivado, si bien, son muy escasos los artículos acerca del PRP en el gato y no hay ningún estudio que evalúe cuál debe ser el número mínimo de PLTs y concentración de FC en plasma requerido para obtener beneficios clínicos. Con todo ello, esta Tesis Doctoral supone un trabajo pionero en el campo de la terapia con PRP en gatos.

Summary

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Summary

For more than four decades, PRP has shown to have modulating and stimulating properties for different cell lines' proliferation, especially for those derived from mesenchymal stem cells, like fibroblasts, endothelial cells, myocytes, chondrocytes, and osteoblasts, among others. In this sense, it is a useful tool in promoting tissue regeneration. The growth factors (GF) located inside the alpha granules of the PLTs are released after PLTs activation, playing their role during the healing process.

For humans, there are several types of PRP commercially available, however, there is a lack of consensus regarding their classification and composition, generating disagreement between research groups. In the veterinary field, the use of this blood derived product is increasing its use with greater guarantees of success in treatment, especially in the field of traumatology, ophthalmology, and wound healing. PRGF®-Endoret® is a type of P-PRP obtained after a single centrifugation process and characterized by a moderate PLTs concentration (1.5-2.5 greater than the basal value), and the absence of RBCs and WBCs. There are many human and veterinary

studies that support this product as a valid treatment in regenerative medicine. However, there are very few studies on the obtaining and clinical application of PRP in cats.

There are different protocols for PRP obtention described in literature depending on the methodology used, thus, the main objective of this work is to standardize a PRP obtention protocol for the cat species. With this aim, the cellular composition of both the PRP and PPP fractions have been compared with the one of the whole bloods. Moreover, the plasmatic concentration of GFs such as PDGF-BB and TGF- β 1 have been analyzed. Another objective of this Doctoral Thesis is to study how the presence of common viral diseases in cats such as leukemia and feline immunodeficiency could have an influence in the quality and composition of this blood derived product. To this end, the doctoral thesis has been divided into three comparative and prospective experimental studies.

The first study was conducted in 30 healthy cats (FeLV and FIV negatives, and with no previous biochemical or hematological alterations). A total of 3 tubes of 9 mL of blood were collected from each cat, and they were randomly assigned to a different centrifugation protocol: 255 g, 260 g, and 265 g for 10 minutes. The cellular composition (PLTs, VPM, RBCs, WBCs, LYMPH, NFS and MON) of the PRP and PPP fractions obtained following the different centrifugation processes were analyzed and compared with the ones of the whole blood, with the aim of determine and standardize the PRP obtention protocol appropriate for cats. Furthermore, the GFs, PDGF-BB and TGF- β 1 concentration was also assessed in the PPP and PRP fractions.

The results obtained in the first study demonstrated that the optimal PLTs concentration was achieved by using the PRGF[®]-Endoret[®] technology when following either of the three proposed protocols. Moreover, the absence of white blood cells and erythrocytes was also accomplished. No significant differences between protocols were obtained, however, the centrifugation process at 265 g for 10 minutes allowed to achieve a PLTs concentration 1.5 times higher than the one of the whole bloods. With regards to the VPM, it was significantly greater in the basal blood than in the PRP and PPP fractions, with no significant differences between protocols. PDGF-BB and TGF- β 1 concentrations were statistically higher in the PRP fraction than in the PPP fraction, with no significant differences between the 255 g and 265g protocols. However, the 260 g protocol showed no significant differences for TGF- β 1 concentration between the PRP and PPP fractions.

Once the PRGF-Endoret obtention protocol for healthy cats was standardized (centrifugation at 265 g for 10 minutes), it was thereafter applied to 11 leukemia positive (FeLV) and 16 feline immunodeficiency positive (FIV) cats.

Regarding the FeLV cats, PLTs were concentrated 1.4 times in comparison with basal blood, while RBCs and WBCs decreased in 99% and 95% respectively. The VPM value did not significantly change between the plasmatic fractions and the whole blood. The TGF- β 1 concentration was significantly higher in the PRP fraction than in the PPP fraction, however, no significant differences for the PDGF-BB were observed between fractions.

Finally, with regards to the FIV cats, the 265 g for 10 minutes centrifugation protocol obtained a PLTs concentration significantly higher in the PRP fraction than in the PPP. However, the PLTs concentration in the PRP fraction was not significantly different to that of the whole blood, being 134.1 times higher in the PRP than in the whole blood. A 99% and 92% decrease in the RBCs and WBCs respectively was achieved both in the PRP and PPP fractions. Moreover, TGF- β 1 concentration was significantly higher in the PRP than in the PPP fraction.

In summary, PRGF-Endoret technology, together with the 265 g for 10 minutes centrifugation protocol, allowed the obtention of a product classified as P-PRP in healthy cats, with a moderated PLTs concentration. Furthermore, the PLTs concentration in FeLV cats did not achieve the minimum required by PRGF-Endoret technology, however, the obtained values were remarkably close to those of healthy cats. On the other hand, the standardized protocol was not reproducible in FIV cats. The physiopathology of the virus that could have a negative effect on the obtention of this blood derived product is unknown, nevertheless, there is little evidence regarding the clinical use of PRP in cats and to our knowledge there is no study in which the minimum PLTs concentration and GFs required to obtain clinical effects are described.

Therewith, this Doctoral Thesis is a pioneer work in the field of PRP therapy in cats.

Bibliografía

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Bibliografía

- Acosta, L., M. Castro, M. Fernandez, E. Oliveres, E. Gomez-Demmel and L. Tartara (2014). "[Treatment of corneal ulcers with platelet rich plasma]." *Arch Soc Esp Oftalmol* 89(2): 48-52.
- Addie, D. D., J. M. Dennis, S. Toth, J. J. Callanan, S. Reid and O. Jarrett (2000). "Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus." *Vet Rec* 146(15): 419-424.
- Alcover, M. M., A. Basurco, A. Fernandez, C. Riera, R. Fisa, A. Gonzalez, M. Verde, A. M. Garrido, H. Ruíz, A. Yzuel and S. Villanueva-Saz (2021). "A cross-sectional study of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR." *Parasit Vectors* 14(1): 178.
- Alsosou, J. and P. Harrison (2017). *Platelet Rich Plasma in Regenerative Medicine*
- *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, pharmacology and therapeutics: An update.* N. K. Paolo Gresele, Jose Lopez, Clive Page, Springer: 1407-1420.
- Andia, I., E. Rubio-Azpeitia, J. J. Martin and M. Abate (2015). *Current Concepts and Translational Uses of Platelet Rich Plasma Biotechnology.* Biotechnology. D. Ekinci: 1-31.
- Angelone, M., V. Conti, C. Biacca, B. Battaglia, L. Pecorari, F. Piana, G. Gnudi, F. Leonardi, R. Ramoni, G. Basini, S. Dotti, S. Renzi, M. Ferrari and S. Grolli (2017). "The Contribution of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma to the Treatment of Chronic Equine Laminitis: A Proof of Concept." *Int J Mol Sci* 18(10).
- Angelou, V., D. Psalla, C. I. Dovas, G. M. Kazakos, C. Marouda, K. Chatzimisios, Z. Kyrana, E. Moutou, M. Karayannopoulou and L. G. Papazoglou (2022). "Locally Injected Autologous Platelet-Rich Plasma Improves Cutaneous Wound Healing in Cats." *Animals (Basel)* 12(15).
- Anitua, E. (1999). "Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants." *Int J Oral Maxillofac Implants* 14(4): 529-535.

- Anitua, E., I. Andia, B. Ardanza, P. Nurden and A. T. Nurden (2004). "Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration." *Thromb Haemost* 91(1): 4-15.
- Anitua, E., F. Muruzábal, A. Riestra, M. De la Fuente and J. Merayo-Llodes (2019). "Galenic validation of plasma rich in growth factors eye drops." *Farm Hosp* 43(2): 45-49.
- Anitua, E., R. Prado and G. Orive (2017). "Plasma rich in growth factors in dogs: Two sides of the same coin." *Dent Res J (Isfahan)* 14(6): 427-428.
- Anitua, E., R. Prado, S. Padilla and G. Orive (2016). "Platelet-rich plasma therapy: another appealing technology for regenerative medicine?" *Regen Med* 11(4): 355-357.
- Anitua, E., M. Sanchez, M. De la Fuente, M. M. Zalduendo and G. Orive (2012). "Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20(9): 1657-1665.
- Anitua, E., M. Sánchez, A. T. Nurden, P. Nurden, G. Orive and I. Andía (2006). "New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies." *Trends Biotechnol* 24(5): 227-234.
- Anitua, E., M. Sánchez, G. Orive and I. Andia (2008). "Delivering growth factors for therapeutics." *Trends Pharmacol Sci* 29(1): 37-41.
- Anitua, E., M. Sánchez, G. Orive and I. Andía (2007). "The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields." *Biomaterials* 28(31): 4551-4560.
- Anitua, E., M. Sánchez, M. M. Zalduendo, M. de la Fuente, R. Prado, G. Orive and I. Andía (2009). "Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors." *Cell Prolif* 42(2): 162-170.
- Anitua, E., M. M. Zalduendo, M. H. Alkhraisat and G. Orive (2013). "Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors." *Ann Anat* 195(5): 461-466.
- Appel, T. R., B. Pöttsch, J. Müller, J. J. von Lindern, S. J. Bergé and R. H. Reich (2002). "Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment." *Clin Oral Implants Res* 13(5): 522-528.
- Arata, S., A. Ohmi, F. Mizukoshi, K. Baba, K. Ohno, A. Setoguchi and H. Tsujimoto (2005). "Urinary transforming growth factor-beta1 in feline chronic renal failure." *J Vet Med Sci* 67(12): 1253-1255.
- Ayllón, T., P. P. Diniz, E. B. Breitschwerdt, A. Villaescusa, F. Rodríguez-Franco and A. Sainz (2012). "Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain." *Vector Borne Zoonotic Dis* 12(2): 143-150.
- Bachmann, M. H., C. Mathiason-Dubard, G. H. Learn, A. G. Rodrigo, D. L. Sodora, P. Mazzetti, E. A. Hoover and J. I. Mullins (1997). "Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades." *J Virol* 71(6): 4241-4253.
- Beebe, A. M., T. G. Gluckstern, J. George, N. C. Pedersen and S. Dandekar (1992). "Detection of feline immunodeficiency virus infection in bone marrow of cats." *Vet Immunol Immunopathol* 35(1-2): 37-49.
- Beitzel, K., D. Allen, J. Apostolakos, R. P. Russell, M. B. McCarthy, G. J. Gallo, M. P. Cote and A. D. Mazzocca (2015). "US definitions, current use, and FDA stance on use of platelet-rich plasma in sports medicine." *J Knee Surg* 28(1): 29-34.
- Beldon, P. (2010). "Basic Science of wound healing." *Surgery* 28: 409-412.
- Bielecki, T. M., T. S. Gazdzik, J. Arendt, T. Szczepanski, W. Król and T. Wielkoszynski (2007). "Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study." *J Bone Joint Surg Br* 89(3): 417-420.
- Bierie, B. and H. L. Moses (2006). "TGF-beta and cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* 17(1-2): 29-40.
- Blair, P. and R. Flaumenhaft (2009). "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates." *Blood Rev* 23(4): 177-189.
- Bohling, M. W., R. A. Henderson, S. F. Swaim, S. A. Kincaid and J. C. Wright (2004). "Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog." *Vet Surg* 33(6): 579-587.
- Boswell, S. G., B. J. Cole, E. A. Sundman, V. Karas and L. A. Fortier (2012). "Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors." *Arthroscopy* 28(3): 429-439.

- Boudreaux, M. K. and S. Ebbe (1998). Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. *Comparative Haematology International* 8: 16-20.
- Boudreaux, M. K., C. D. Osborne, A. C. Herre, E. R. Rivera and E. A. Spangler (2010). "Unique structure of the M loop region of β 1-tubulin may contribute to size variability of platelets in the family Felidae." *Vet Clin Pathol* 39(4): 417-423.
- Brooks, M. and J. Catalfamo (2010). Von Willebrand Disease. Schalm's veterinary hematology. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell: 613.
- Callanan, J. J., B. A. Jones, J. Irvine, B. J. Willett, I. A. McCandlish and O. Jarrett (1996). "Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections." *Vet Pathol* 33(3): 264-272.
- Candela, M. G., A. Fanelli, J. Carvalho, E. Serrano, G. Domenech, F. Alonso and C. Martínez-Carrasco (2022). "Urban landscape and infection risk in free-roaming cats." *Zoonoses Public Health* 69(4): 295-311.
- Carlton, C., J. M. Norris, E. Hall, M. P. Ward, S. Blank, S. Gilmore, A. Dabydeen, V. Tran and M. E. Westman (2022). "Clinicopathological and Epidemiological Findings in Pet Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus (FIV) in Australia." *Viruses* 14(10).
- Carmona, J. U., C. López and J. A. Sandoval (2012). "Review of the currently available system to obtain platelet related products to treat equine musculo-skeletal injuries." *Recent Patents on Regenerative Medicine* 3: 148-159.
- Carr, B. J., S. O. Canapp, D. R. Mason, C. Cox and T. Hess (2015). "Canine Platelet-Rich Plasma Systems: A Prospective Analysis." *Front Vet Sci* 2: 73.
- Castillo, T. N., M. A. Pouliot, H. J. Kim and J. L. Dragoo (2011). "Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems." *Am J Sports Med* 39(2): 266-271.
- Chandler, J. C. and B. S. Beale (2002). "Feline orthopedics." *Clin Tech Small Anim Pract* 17(4): 190-203.
- Checás Rojas, A. (2018). "Método: Conversión de las fuerzas g (RCF) a revoluciones por minuto (rpm) y Equilibrio del rotor. ." Retrieved 14/07/2023.
- Chicharro, D., J. M. Carrillo, M. Rubio, R. Cugat, B. Cuervo, S. Guil, J. Forteza, V. Moreno, J. M. Vilar and J. Sopena (2018). "Combined plasma rich in growth factors and adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the cutaneous wound healing in rabbits." *BMC Vet Res* 14(1): 288.
- Chicharro-Alcántara, D., M. Rubio-Zaragoza, E. Damiá-Giménez, J. M. Carrillo-Poveda, B. Cuervo-Serrato, P. Peláez-Gorrea and J. J. Sopena-Juncosa (2018). "Platelet Rich Plasma: New Insights for Cutaneous Wound Healing Management." *J Funct Biomater* 9(1).
- Chiu, E. S., E. A. Hoover and S. VandeWoude (2018). "A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing." *Viruses* 10(1).
- Choi, B. H., S. J. Zhu, B. Y. Kim, J. Y. Huh, S. H. Lee and J. H. Jung (2005). "Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study." *Int J Oral Maxillofac Surg* 34(4): 420-424.
- Chuma, H., H. Mizuta, S. Kudo, K. Takagi and Y. Hiraki (2004). "One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits." *Osteoarthritis Cartilage* 12(10): 834-842.
- Chun, N., S. Canapp, B. J. Carr, V. Wong and J. Curry (2020). "Validation and Characterization of Platelet-Rich Plasma in the Feline: A Prospective Analysis." *Front Vet Sci* 7: 512.
- Cicha, I. and M. Goppelt-Struebe (2009). "Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation." *Biofactors* 35(2): 200-208.
- Clemmons, R. M., E. L. Bliss, M. R. Dorsey-Lee, C. L. Seachord and K. M. Meyers (1983). "Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals." *Thromb Haemost* 50(4): 838-843.
- Cuervo, B., M. Rubio, J. Sopena, J. M. Dominguez, J. Vilar, M. Morales, R. Cugat and J. M. Carrillo (2014). "Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors." *Int J Mol Sci* 15(8): 13437-13460.
- D'asta, F., F. Halstead, P. Harrison, S. Zecchi Orlandini, N. Moiemmen and J. Lord (2018). "The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: A systematic review." *Platelets* 29(1): 9-20.

- Damià Giménez, E., J. M. Carrillo Poveda, M. Rubio Zaragoza and J. J. Sopena Juncosa (2012). Estudio experimental sobre la influencia del plasma rico en factores de crecimiento en la concentración seria del factor de crecimiento insulínico tipo I y la proteína C-reactiva en la especie canina . Universidad CEU Cardenal Herrera.
- Damon, S. E., K. L. Haugk, R. S. Birnbaum and L. S. Quinn (1998). "Retrovirally mediated overexpression of insulin-like growth factor binding protein 4: evidence that insulin-like growth factor is required for skeletal muscle differentiation." *J Cell Physiol* 175(1): 109-120.
- Davidow, B. (2013). "Transfusion medicine in small animals." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 43(4): 735-756.
- de Rozieres, S., J. Thompson, M. Sundstrom, J. Gruber, D. S. Stump, A. P. de Parseval, S. VandeWoude and J. H. Elder (2008). "Replication properties of clade A/C chimeric feline immunodeficiency viruses and evaluation of infection kinetics in the domestic cat." *J Virol* 82(16): 7953-7963.
- Deuel, T. F., J. S. Huang, R. T. Proffitt, J. U. Baenziger, D. Chang and B. B. Kennedy (1981). "Human platelet-derived growth factor. Purification and resolution into two active protein fractions." *J Biol Chem* 256(17): 8896-8899.
- Dhurat, R. and M. Sukesh (2014). "Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective." *J Cutan Aesthet Surg* 7(4): 189-197.
- Dionyssiou, D., E. Demiri, P. Foroglou, A. Cheva, N. Saratzis, C. Aivazidis and G. Karkavelas (2013). "The effectiveness of intralesional injection of platelet-rich plasma in accelerating the healing of chronic ulcers: an experimental and clinical study." *Int Wound J* 10(4): 397-406.
- Dohan Ehrenfest, D. M., I. Andia, M. A. Zumstein, C. Q. Zhang, N. R. Pinto and T. Bielecki (2014). "Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives." *Muscles Ligaments Tendons J* 4(1): 3-9.
- Dohan Ehrenfest, D. M., T. Bielecki, A. Mishra, P. Borzini, F. Inchingolo, G. Sammartino, L. Rasmusson and P. A. 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(7): 1131-1137.
- Dohan Ehrenfest, D. M., L. Rasmusson and T. Albrektsson (2009). "Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)." *Trends Biotechnol* 27(3): 158-167.
- Edelblute, C. M., A. L. Donate, B. Y. Hargrave and L. C. Heller (2015). "Human platelet gel supernatant inactivates opportunistic wound pathogens on skin." *Platelets* 26(1): 13-16.
- Ellis, J., R. Bell, D. C. Barnes and R. Miller (2018). "Prevalence and disease associations in feline thrombocytopenia: a retrospective study of 194 cases." *J Small Anim Pract*.
- Englert, T., H. Lutz, C. Sauter-Louis and K. Hartmann (2012). "Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany." *J Feline Med Surg* 14(6): 392-398.
- Etulain, J. (2018). "Platelets in wound healing and regenerative medicine." *Platelets* 29(6): 556-568.
- Everts, P., K. Onishi, P. Jayaram, J. F. Lana and K. Mautner (2020). "Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020." *Int J Mol Sci* 21(20).
- Everts, P. A., A. van Erp, A. DeSimone, D. S. Cohen and R. D. Gardner (2021). "Platelet Rich Plasma in Orthopedic Surgical Medicine." *Platelets* 32(2): 163-174.
- Everts, P. A., A. van Zundert, J. P. Schönberger, R. J. Devilee and J. T. Knape (2008). "What do we use: platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel?" *J Biomed Mater Res A* 85(4): 1135-1136.
- Fabbro, M. D., M. Bortolin, S. Taschieri, C. Ceci and R. L. Weinstein (2016). "Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence." *Platelets* 27(4): 276-285.
- Fadadu, P. P., A. J. Mazzola, C. W. Hunter and T. T. Davis (2019). "Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: a call for PRP standardization." *Reg Anesth Pain Med*.
- Farghali, H. A., N. A. AbdElKader, H. O. AbuBakr, E. S. Ramadan, M. S. Khattab, N. Y. Salem and I. A. Emam (2021). "Corneal Ulcer in Dogs and Cats: Novel Clinical Application of Regenerative Therapy Using Subconjunctival Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma." *Front Vet Sci* 8: 641265.

- Farid, M. F., Y. S. Abouelela, N. A. E. Yasin, M. R. Mousa, M. A. Ibrahim, A. Prince and H. Rizk (2022). "A novel cell-free intrathecal approach with PRP for the treatment of spinal cord multiple sclerosis in cats." *Inflamm Regen* 42(1): 45.
- Fedorova, N. V., A. L. Ksenofontov, M. V. Serebryakova, V. I. Stadnichuk, T. V. Gaponova, L. A. Baratova, G. F. Sud'ina and S. I. Galkina (2018). "Neutrophils Release Metalloproteinases during Adhesion in the Presence of Insulin, but Cathepsin G in the Presence of Glucagon." *Mediators Inflamm* 2018: 1574928.
- Fernández-Sarmiento, J. A., J. M. Domínguez, M. M. Granados, J. Morgaz, R. Navarrete, J. M. Carrillo, R. J. Gómez-Villamandos, P. Muñoz-Rascón, J. Martín de Las Mulas, Y. Millán, M. García-Ballebó and R. Cugat (2013). "Histological study of the influence of plasma rich in growth factors (PRGF) on the healing of divided Achilles tendons in sheep." *J Bone Joint Surg Am* 95(3): 246-255.
- Ferrari, J. T. and P. Schwartz (2020). "Prospective Evaluation of Feline Sourced Platelet-Rich Plasma Using Centrifuge-Based Systems." *Front Vet Sci* 7: 322.
- Filardo, G., E. Kon, M. T. Pereira Ruiz, F. Vaccaro, R. Guitaldi, A. Di Martino, A. Cenacchi, P. M. Fornasari and M. Marcacci (2012). "Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20(10): 2082-2091.
- Forbes, S. J. and N. Rosenthal (2014). "Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy." *Nat Med* 20(8): 857-869.
- Franklin, S. P., B. C. Garner and J. L. Cook (2015). "Characteristics of canine platelet-rich plasma prepared with five commercially available systems." *Am J Vet Res* 76(9): 822-827.
- Fujino, Y., H. Horiuchi, F. Mizukoshi, K. Baba, Y. Goto-Koshino, K. Ohno and H. Tsujimoto (2009). "Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection." *Vet Microbiol* 136(3-4): 217-225.
- Fukuda, A., K. Kato, M. Hasegawa, H. Hirata, A. Sudo, K. Okazaki, K. Tsuta, Y. Shikinami and A. Uchida (2005). "Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor." *Biomaterials* 26(20): 4301-4308.
- Gant, P., D. McBride and K. Humm (2020). "Abnormal platelet activity in dogs and cats - impact and measurement." *J Small Anim Pract* 61(1): 3-18.
- Geburek, F., M. Gaus, H. T. van Schie, K. Rohn and P. M. Stadler (2016). "Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies - a randomized prospective controlled clinical trial." *BMC Vet Res* 12(1): 191.
- Gemignani, F., A. Perazzi and I. Iacopetti (2017). "Use of canine sourced platelet-rich plasma in a feline contaminated cutaneous wound." *Can Vet J* 58(2): 141-144.
- Gentile, P. and S. Garcovich (2020). "Systematic Review-The Potential Implications of Different Platelet-Rich Plasma (PRP) Concentrations in Regenerative Medicine for Tissue Repair." *Int J Mol Sci* 21(16).
- George, J. N. (2000). "Platelets." *Lancet* 355(9214): 1531-1539.
- Giacomello, M., A. Giacomello, C. Mortellaro, G. Gallesio and M. Mozzati (2015). "Temporomandibular joint disorders treated with articular injection: the effectiveness of plasma rich in growth factors-Endoret." *J Craniofac Surg* 26(3): 709-713.
- Giacomello, M. S., C. Mortellaro, A. Giacomello, J. J. Scali and A. Greco Lucchina (2021). "Management of large perforations of the sinus mucosa with PRGF-Endoret® platelet concentrate." *J Biol Regul Homeost Agents* 35(2 Suppl. 1): 9-19.
- Giannini, S., A. Cielo, L. Bonanome, C. Rastelli, C. Derla, F. Corpaci and G. Falisi (2015). "Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19(6): 927-930.
- Giraldo, C. E., M. E. Álvarez and J. U. Carmona (2015). "Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel." *BMC Vet Res* 11: 60.
- Giusti, I., A. Rughetti, S. D'Ascenzo, G. Di Stefano, M. R. Nanni, D. Millimaggi, L. Dell'orso and V. Dolo (2013). "The effects of platelet gel-released supernatant on human fibroblasts." *Wound Repair Regen* 21(2): 300-308.

- Giusti, I., A. Rughetti, S. D'Ascenzo, D. Millimaggi, A. Pavan, L. Dell'Orso and V. Dolo (2009). "Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells." *Transfusion* 49(4): 771-778.
- Gleich, S. and K. Hartmann (2009). "Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats." *J Vet Intern Med* 23(3): 552-558.
- Goldkamp, C. E., J. K. Levy, C. H. Edinboro and J. L. Lachtara (2008). "Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats with abscesses or bite wounds and rate of veterinarian compliance with current guidelines for retrovirus testing." *J Am Vet Med Assoc* 232(8): 1152-1158.
- Gospodarowicz, D. and J. Cheng (1987). "Growth of myoblasts in lipoprotein-supplemented, serum-free medium: regulation of proliferation by acidic and basic fibroblast growth factor." *In Vitro Cell Dev Biol* 23(7): 507-514.
- Grageda, E. (2004). "Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol." *Implant Dent* 13(4): 301-309.
- Grageda, E., J. L. Lozada, P. J. Boyne, N. Caplanis and P. J. McMillan (2005). "Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep." *J Oral Implantol* 31(1): 2-17.
- Halpin, R. E., R. S. Saunders, B. J. Thompson, A. S. Rohde Newgent, J. Amorim, G. N. Melillo and A. E. DeClue (2016). "Evaluation of a feline-specific multiplex, bead-based assay for detection of cytokines, chemokines, growth factors, and other immunologically active proteins in serum and plasma samples from cats." *Am J Vet Res* 77(5): 495-504.
- Hart, S. and I. Nolte (1991). "[Thrombocyte aggregation in the cat]." *Tierarztl Prax* 19(4): 413-418.
- Hart, S. W. and I. Nolte (1994). "Hemostatic disorders in feline immunodeficiency virus-seropositive cats." *J Vet Intern Med* 8(5): 355-362.
- Hartmann, K. (1998). "Feline immunodeficiency virus infection: an overview." *Vet J* 155(2): 123-137.
- Hartmann, K. (2011). "Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection." *Vet Immunol Immunopathol* 143(3-4): 190-201.
- Hartmann, K. (2012). "Clinical aspects of feline retroviruses: a review." *Viruses* 4(11): 2684-2710.
- Hartmann, K. and R. Hofmann-Lehmann (2020). "What's New in Feline Leukemia Virus Infection." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 50(5): 1013-1036.
- Harvey, J. W. (2017). "The feline blood film." *J Feline Med Surg* 19(7): 747-757.
- Hayward, J. J. and A. G. Rodrigo (2010). "Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*)." *Vet Immunol Immunopathol* 134(1-2): 68-74.
- Hee, H. T., M. E. Majd, R. T. Holt and L. Myers (2003). "Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion?" *Eur Spine J* 12(4): 400-407.
- Heijnen, H. and P. van der Sluijs (2015). "Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not?" *J Thromb Haemost* 13(12): 2141-2151.
- Hellard, E., D. Fouchet, H. Santin-Janin, B. Tarin, V. Badol, C. Coupier, G. Leblanc, H. Poulet and D. Pontier (2011). "When cats' ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*)." *Prev Vet Med* 101(3-4): 250-264.
- Henriksen, P. A. (2014). "The potential of neutrophil elastase inhibitors as anti-inflammatory therapies." *Curr Opin Hematol* 21(1): 23-28.
- Hofmann-Lehmann, R., E. Gönczi, B. Riond, M. Meli, B. Willi, J. Howard, D. Schaarschmidt-Kiener, W. Regli, U. Gilli and F. Boretti (2018). "[Feline leukemia virus infection: importance and current situation in Switzerland]." *Schweiz Arch Tierheilkd* 160(2): 95-105.
- Hofmann-Lehmann, R. and K. Hartmann (2020). "Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis." *J Feline Med Surg* 22(9): 831-846.
- Hofmann-Lehmann, R., E. Holznagel, A. Aubert, K. Bauer-Pham and H. Lutz (1995). "FIV vaccine studies. II. Clinical findings, hematological changes and kinetics of blood lymphocyte subsets." *Vet Immunol Immunopathol* 46(1-2): 115-125.
- Hofmann-Lehmann, R., E. Holznagel, P. Ossent and H. Lutz (1997). "Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets." *Clin Diagn Lab Immunol* 4(1): 33-42.

- Hosie, M. J., D. Addie, S. Belák, C. Boucraut-Baralon, H. Egberink, T. Frymus, T. Gruffydd-Jones, K. Hartmann, A. Lloret, H. Lutz, F. Marsilio, M. G. Pennisi, A. D. Radford, E. Thiry, U. Truyen and M. C. Horzinek (2009). "Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management." *J Feline Med Surg* 11(7): 575-584.
- Hosie, M. J., C. Robertson and O. Jarrett (1989). "Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom." *Vet Rec* 125(11): 293-297.
- Howes, R., J. M. Bowness, G. R. Grotendorst, G. R. Martin and A. H. Reddi (1988). "Platelet-derived growth factor enhances demineralized bone matrix-induced cartilage and bone formation." *Calcif Tissue Int* 42(1): 34-38.
- Ikumi, A., Y. Hara, T. Yoshioka, A. Kanamori and M. Yamazaki (2018). "Effect of local administration of platelet-rich plasma (PRP) on peripheral nerve regeneration: An experimental study in the rabbit model." *Microsurgery* 38(3): 300-309.
- Intravia, J., D. A. Allen, T. J. Durant, M. B. McCarthy, R. Russell, K. Beitzel, M. P. Cote, F. Dias and A. D. Mazzocca (2014). "In vitro evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood." *Muscles Ligaments Tendons J* 4(1): 79-84.
- Ishida, T., T. Washizu, K. Toriyabe, S. Motoyoshi, I. Tomoda and N. C. Pedersen (1989). "Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan." *J Am Vet Med Assoc* 194(2): 221-225.
- Ivkovic, S., B. S. Yoon, S. N. Popoff, F. F. Safadi, D. E. Libuda, R. C. Stephenson, A. Daluiski and K. M. Lyons (2003). "Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development." *Development* 130(12): 2779-2791.
- Jackson, S. R. and J. M. Carter (1993). "Platelet volume: laboratory measurement and clinical application." *Blood Rev* 7(2): 104-113.
- JARRETT, W. F., W. B. MARTIN, G. W. CRIGHTON, R. G. DALTON and M. F. STEWART (1964). "TRANSMISSION EXPERIMENTS WITH LEUKEMIA (LYMPHOSARCOMA)." *Nature* 202: 566-567.
- Jordan, H. L., C. B. Grindem and E. B. Breitschwerdt (1993). "Thrombocytopenia in cats: a retrospective study of 41 cases." *J Vet Intern Med* 7(5): 261-265.
- Joshi, A., T. W. Vahlenkamp, H. Garg, W. A. Tompkins and M. B. Tompkins (2004). "Preferential replication of FIV in activated CD4(+)CD25(+)T cells independent of cellular proliferation." *Virology* 321(2): 307-322.
- Kaye, S., W. Wang, C. Miller, A. McLuckie, J. A. Beatty, C. K. Grant, S. VandeWoude and H. Bielefeldt-Ohmann (2016). "Role of Feline Immunodeficiency Virus in Lymphomagenesis--Going Alone or Colluding?" *ILAR J* 57(1): 24-33.
- Kececi, Y., S. Ozsu and O. Bilgir (2014). "A cost-effective method for obtaining standard platelet-rich plasma." *Wounds* 26(8): 232-238.
- KINGSLEY, C. S. (1954). "Blood coagulation; evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma." *Nature* 173(4407): 723-724.
- Klinger, M. H. and W. Jelkmann (2002). "Role of blood platelets in infection and inflammation." *J Interferon Cytokine Res* 22(9): 913-922.
- Knoll, J. S. and S. L. Rowell (1996). "Clinical hematology. In-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26(5): 981-1002.
- Kofler, N. and M. Simons (2016). "The expanding role of neuropilin: regulation of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor signaling in the vasculature." *Curr Opin Hematol* 23(3): 260-267.
- Kon, E., B. Di Matteo, D. Delgado, B. J. Cole, A. Dorotei, J. L. Dragoo, G. Filardo, L. A. Fortier, A. Giuffrida, C. H. Jo, J. Magalon, G. A. Malanga, A. Mishra, N. Nakamura, S. A. Rodeo, S. Sampson and M. Sánchez (2020). "Platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis: an expert opinion and proposal for a novel classification and coding system." *Expert Opin Biol Ther* 20(12): 1447-1460.
- Krecic, M. R., S. Velineni, P. Meeus, H. Fan and M. Loenser (2018). "Diagnostic performances of two rapid tests for detection of feline leukemia virus antigen in sera of experimentally feline leukemia virus-infected cats." *JFMS Open Rep* 4(1): 2055116917748117.
- Lana, J. F., A. Macedo, I. L. G. Ingraio, S. C. Huber, G. S. Santos and M. H. A. Santana (2019). "Leukocyte-rich PRP for knee osteoarthritis: Current concepts." *J Clin Orthop Trauma* 10(Suppl 1): S179-S182.

- Landesberg, R., M. Roy and R. S. Glickman (2000). "Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation." *J Oral Maxillofac Surg* 58(3): 297-300; discussion 300-291.
- Lawrence, J., Y. M. Chang, B. Szladovits, L. J. Davison and O. A. Garden (2013). "Breed-specific hematological phenotypes in the dog: a natural resource for the genetic dissection of hematological parameters in a mammalian species." *PLoS One* 8(11): e81288.
- LeCouter, J., R. Lin and N. Ferrara (2002). "The role of EG-VEGF in the regulation of angiogenesis in endocrine glands." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67: 217-221.
- Lee, I. T., J. K. Levy, S. P. Gorman, P. C. Crawford and M. R. Slater (2002). "Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virus in unowned free-roaming cats." *J Am Vet Med Assoc* 220(5): 620-622.
- Leitner, G. C., R. Gruber, J. Neumüller, A. Wagner, P. Kloimstein, P. Höcker, G. F. Körmöczi and C. Buchta (2006). "Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems." *Vox Sang* 91(2): 135-139.
- Levy, J. K., H. M. Scott, J. L. Lachtara and P. C. Crawford (2006). "Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity." *J Am Vet Med Assoc* 228(3): 371-376.
- Little, S., J. Levy, K. Hartmann, R. Hofmann-Lehmann, M. Hosie, G. Olah and K. S. Denis (2020). "2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines." *J Feline Med Surg* 22(1): 5-30.
- Little, S., W. Sears, J. Lachtara and D. Bienzle (2009). "Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada." *Can Vet J* 50(6): 644-648.
- Liu, X., W. Shen, Y. Yang and G. Liu (2011). "Therapeutic implications of mesenchymal stem cells transfected with hepatocyte growth factor transplanted in rat kidney with unilateral ureteral obstruction." *J Pediatr Surg* 46(3): 537-545.
- Louwerens, M., C. A. London, N. C. Pedersen and L. A. Lyons (2005). "Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era." *J Vet Intern Med* 19(3): 329-335.
- Lutz, H., D. Addie, S. Belák, C. Boucraut-Baralon, H. Egberink, T. Frymus, T. Gruffydd-Jones, K. Hartmann, M. J. Hosie, A. Lloret, F. Marsilio, M. G. Pennisi, A. D. Radford, E. Thiry, U. Truyen and M. C. Horzinek (2009). "Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management." *J Feline Med Surg* 11(7): 565-574.
- Maddaluno, L., C. Urwyler and S. Werner (2017). "Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair." *Development* 144(22): 4047-4060.
- Madonna, R., C. Cevik, M. Nasser and R. De Caterina (2012). "Hepatocyte growth factor: molecular biomarker and player in cardioprotection and cardiovascular regeneration." *Thromb Haemost* 107(4): 656-661.
- Magalon, J., A. L. Chateau, B. Bertrand, M. L. Louis, A. Silvestre, L. Giraudo, J. Veran and F. Sabatier (2016). "DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices." *BMJ Open Sport Exerc Med* 2(1): e000060.
- Marlovits, S., M. Mousavi, C. Gäbler, J. Erdös and V. Vécsei (2004). "A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note." *Eur Spine J* 13 Suppl 1(Suppl 1): S102-106.
- Marx, R. E. (2001). "Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?" *Implant Dent* 10(4): 225-228.
- Marx, R. E. (2004). "Platelet-rich plasma: evidence to support its use." *J Oral Maxillofac Surg* 62(4): 489-496.
- Marx, R. E., E. R. Carlson, R. M. Eichstaedt, S. R. Schimmele, J. E. Strauss and K. R. Georgeff (1998). "Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85(6): 638-646.
- Maureen, M. (2005). Primary hemostasis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 15: 1-8.
- Mazzucco, L., V. Balbo, E. Cattana and P. Borzini (2008). "Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex." *Vox Sang* 94(3): 202-208.
- Mazzucco, L., V. Balbo, E. Cattana, R. Guaschino and 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 Sang* 97(2): 110-118.

- Mazzucco, L., V. Balbo and R. Guaschino (2012). "Reasonable compromise" to define the quality standards of platelet concentrate for non-transfusion use (CPunT)." *Transfus Apher Sci* 47(2): 207-211.
- McCarrel, T. M., T. Minas and L. A. Fortier (2012). "Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy." *J Bone Joint Surg Am* 94(19): e143(141-148).
- Mehta, S. and J. T. Watson (2008). "Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications." *J Orthop Trauma* 22(6): 432-438.
- Melo, B. A. G., Â. Luzo, J. F. S. D. Lana and M. H. A. Santana (2019). "Centrifugation Conditions in the L-PRP Preparation Affect Soluble Factors Release and Mesenchymal Stem Cell Proliferation in Fibrin Nanofibers." *Molecules* 24(15).
- Menetrey, J., C. Kasemkijwattana, C. S. Day, P. Bosch, M. Vogt, F. H. Fu, M. S. Moreland and J. Huard (2000). "Growth factors improve muscle healing in vivo." *J Bone Joint Surg Br* 82(1): 131-137.
- Meseguer, J., M. A. Esteban and A. Rodríguez (2002). "Are thrombocytes and platelets true phagocytes?" *Microsc Res Tech* 57(6): 491-497.
- Miró, G., C. Rupérez, R. Checa, R. Gálvez, L. Hernández, M. García, I. Canorea, V. Marino and A. Montoya (2014). "Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis?" *Parasit Vectors* 7: 112.
- Mitander W., M. (2008). Evaluation of platelet parameters from Advia 2120 and Sysmex XT-2000iV in samples from dogs, horses and cats., Uppsala University.
- Miyazawa, T. and O. Jarrett (1997). "Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats." *Arch Virol* 142(2): 323-332.
- Montoya, A., M. García, R. Gálvez, R. Checa, V. Marino, J. Sarquis, J. P. Barrera, C. Rupérez, L. Caballero, C. Chicharro, I. Cruz and G. Miró (2018). "Implications of zoonotic and vector-borne parasites to free-roaming cats in central Spain." *Vet Parasitol* 251: 125-130.
- Moojen, D. J., P. A. Everts, R. M. Schure, E. P. Overvest, A. van Zundert, J. T. Knape, R. M. Castelein, L. B. Creemers and W. J. Dhert (2008). "Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*." *J Orthop Res* 26(3): 404-410.
- Moritz, A. and C. Hoffmann (1997). "[Platelet count in the cat]." *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 25(6): 695-700.
- Moser, M., C. C. Burns, S. Boomer and J. Overbaugh (1998). "The host range and interference properties of two closely related feline leukemia variants suggest that they use distinct receptors." *Virology* 242(2): 366-377.
- Murphy, B., N. Vapniarsky, C. Hillman, D. Castillo, S. McDonnel, P. Moore, P. A. Luciw and E. E. Sparger (2012). "FIV establishes a latent infection in feline peripheral blood CD4+ T lymphocytes in vivo during the asymptomatic phase of infection." *Retrovirology* 9: 12.
- Nash, T. J., C. R. Howlett, C. Martin, J. Steele, K. A. Johnson and D. J. Hicklin (1994). "Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits." *Bone* 15(2): 203-208.
- Navarro, R., A. Pino, A. Martínez-Andrés, E. Garrigós, M. L. Sánchez, E. Gallego and E. Anitua (2020). "Combined therapy with Endoret-Gel and plasma rich in growth factors vs Endoret-Gel alone in the management of facial rejuvenation: A comparative study." *J Cosmet Dermatol* 19(10): 2616-2626.
- Norman, E. J., R. C. Barron, A. S. Nash and R. B. Clampitt (2001). "Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell Counts." *Vet Clin Pathol* 30(3): 124-132.
- Norman, E. J., R. C. Barron, A. S. Nash and R. B. Clampitt (2001). "Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation." *Vet Clin Pathol* 30(3): 137-140.
- Nurden, A. T. (2018). "The biology of the platelet with special reference to inflammation, wound healing and immunity." *Front Biosci (Landmark Ed)* 23(4): 726-751.
- Oliver Ballester, C., A. García De Carellán Mateo, N. López Sepúlveda, C. Soler I Canet and C. I. Serra Aguado (2017). Estandarización de un protocolo de Plasma Rico en Plaquetas en la especie felina. XI Southern European Veterinary Conference, Barcelona, Spain.
- Pedersen, N. C., E. W. Ho, M. L. Brown and J. K. Yamamoto (1987). "Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome." *Science* 235(4790): 790-793.

- Pedersen, N. C., C. M. Leutenegger, J. Woo and J. Higgins (2001). "Virulence differences between two field isolates of feline immunodeficiency virus (FIV-APetaluma and FIV-CPGammar) in young adult specific pathogen free cats." *Vet Immunol Immunopathol* 79(1-2): 53-67.
- Pelletier, J. P. and J. Martel-Pelletier (1994). "[Role of synovial inflammation, cytokines and IGF-1 in the physiopathology of osteoarthritis]." *Rev Rhum Ed Fr* 61(9 Pt 2): 103S-108S.
- Perazzi, A., R. Busetto, T. Martinello, M. Drigo, D. Pasotto, F. Cian, M. Patruno and I. Iacopetti (2013). "Description of a double centrifugation tube method for concentrating canine platelets." *BMC Vet Res* 9: 146.
- Perut, F., G. Filardo, E. Mariani, A. Cenacchi, L. Pratelli, V. Devescovi, E. Kon, M. Marcacci, A. Facchini, N. Baldini and D. Granchi (2013). "Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells." *Cytotherapy* 15(7): 830-839.
- Phillipson, M. and P. Kubes (2019). "The Healing Power of Neutrophils." *Trends Immunol* 40(7): 635-647.
- Priolo, V., M. Masucci, G. Donato, L. Solano-Gallego, P. Martínez-Orellana, M. F. Persichetti, A. Raya-Bermúdez, F. Vitale and M. G. Pennisi (2022). "Association between feline immunodeficiency virus and *Leishmania infantum* infections in cats: a retrospective matched case-control study." *Parasit Vectors* 15(1): 107.
- Rahhal-Ortuño, M., A. S. Fernández-Santodomingo, C. Martínez-Rubio, H. Barranco-González, I. Almor-Palacios and A. Rodrigo-Hernández (2021). "Use of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret®) fibrin membrane to cover corneal dellen." *Rom J Ophthalmol* 65(3): 293-295.
- Reckenbeil, J., D. Kraus, H. Stark, B. Rath-Deschner, A. Jäger, M. Wenghoefer, J. Winter and W. Götz (2017). "Insulin-like growth factor 1 (IGF1) affects proliferation and differentiation and wound healing processes in an inflammatory environment with p38 controlling early osteoblast differentiation in periodontal ligament cells." *Arch Oral Biol* 73: 142-150.
- Repsold, L. and A. M. Joubert (2018). "Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death." *Biomed Res Int* 2018: 9405617.
- Riond, B., A. K. Waßmuth, S. Hartnack, R. Hofmann-Lehmann and H. Lutz (2015). "Study on the kinetics and influence of feline platelet aggregation and deaggregation." *BMC Vet Res* 11: 276.
- Rittié, L. (2016). "Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals." *J Cell Commun Signal* 10(2): 103-120.
- Rodríguez Flores, J., M. A. Palomar Gallego and J. Torres García-Denche (2012). *Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial*. Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial, Elsevier. 34: 8-17.
- Romero, A., L. Barrachina, B. Ranera, A. R. Remacha, B. Moreno, I. de Blas, A. Sanz, F. J. Vázquez, A. Vitoria, C. Junquera, P. Zaragoza and C. Rodellar (2017). "Comparison of autologous bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells, and platelet rich plasma, for treating surgically induced lesions of the equine superficial digital flexor tendon." *Vet J* 224: 76-84.
- Rossi, L. A., I. R. Murray, C. R. Chu, G. F. Muschler, S. A. Rodeo and N. S. Piuze (2019). "Classification systems for platelet-rich plasma." *Bone Joint J* 101-B(8): 891-896.
- Ruiz-Copegui, R. (2000). Congenital and acquired vascular wall diseases, In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia, Lippincott, Williams, & Wilkins.
- Rushton, J. O., E. Kammergruber, A. Tichy, M. Egerbacher, B. Nell and S. Gabner (2018). "Effects of three blood derived products on equine corneal cells, an in vitro study." *Equine Vet J* 50(3): 356-362.
- Russel, K. (2010). *Platelet Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia*. Schalm's Veterinary Hematology. D. J. Weiss and K. J. Wardrop. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell: 576-585.
- Russel, K. E. (2010). "Platelets Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia", in *Schalm's Veterinary Hematology*, ed. D.J. Weiss, K.J. Wardrop. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell: 576-585.
- Schmidt, M. B., E. H. Chen and S. E. Lynch (2006). "A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair." *Osteoarthritis Cartilage* 14(5): 403-412.
- Seta, N. and M. Kuwana (2007). "Human circulating monocytes as multipotential progenitors." *Keio J Med* 56(2): 41-47.

- Shelton, G., R. Waltier, S. Connor and C. Grant (1989). "Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in pet cats." *Journal of the American Animal Hospital Association* 25: 7-12.
- Silva, R., C. Rezende, F. Paes-Leme and J. Carmona (2011). "Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas felinas: estudio celular." *Archivos de Medicina Veterinaria*(43): 187-190.
- Silva, R. F., M. E. Alvarez, D. L. Ríos, C. López, J. U. Carmona and C. M. Rezende (2012). "Evaluation of the effect of calcium gluconate and bovine thrombin on the temporal release of transforming growth factor beta 1 and platelet-derived growth factor isoform BB from feline platelet concentrates." *BMC Vet Res* 8: 212.
- Silva, R. F., J. U. Carmona and C. M. Rezende (2012). "Comparison of the effect of calcium gluconate and batroxobin on the release of transforming growth factor beta 1 in canine platelet concentrates." *BMC Vet Res* 8: 121.
- Silva, R. F., J. U. Carmona and C. M. Rezende (2013). "Ultrastructural characteristics of fibrin clots from canine and feline platelet concentrates activated with calcium gluconate or calcium gluconate plus batroxobin." *BMC Vet Res* 9: 77.
- Silverberg, G. D., C. B. Harbury and E. Rubenstein (1977). "A physiological sealant for cerebrospinal fluid leaks." *J Neurosurg* 46(2): 215-219.
- Soares, R. M. and S. Prazeres Lopes (2021). "Plasma rich in growth factors (PRGF -ENDORET®) to rescue necrotized orbital dermis-fat grafts." *Orbit*: 1-5.
- Solakoglu, Ö., G. Heydecke, N. Amiri and E. Anitua (2020). "The use of plasma rich in growth factors (PRGF) in guided tissue regeneration and guided bone regeneration. A review of histological, immunohistochemical, histomorphometrical, radiological and clinical results in humans." *Ann Anat* 231: 151528.
- Song, Y. S., H. J. Lee, S. H. Doo, S. J. Lee, I. Lim, K. T. Chang and S. U. Kim (2012). "Mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor (HGF) inhibit collagen deposit and improve bladder function in rat model of bladder outlet obstruction." *Cell Transplant* 21(8): 1641-1650.
- Spada, E., D. Proverbio, A. della Pepa, R. Perego, L. Baggiani, G. B. DeGiorgi, G. Domenichini, E. Ferro and F. Cremonesi (2012). "Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data." *J Feline Med Surg* 14(6): 369-377.
- Sprißler, F., P. Jongwattanapisan, S. Luengyosuechakul, R. Pusoonthornthum, S. Reese, M. Bergmann and K. Hartmann (2021). "Prevalence and Risk Factors of Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus Infection in Healthy Cats in Thailand." *Front Vet Sci* 8: 764217.
- Stief, M., J. Gottschalk, J. C. Ionita, A. Einspanier, G. Oechtering and P. Böttcher (2011). "Concentration of platelets and growth factors in canine autologous conditioned plasma." *Vet Comp Orthop Traumatol* 24(2): 122-125.
- Studer, N., H. Lutz, C. Saegerman, E. Gönczi, M. L. Meli, G. Boo, K. Hartmann, M. J. Hosie, K. Moestl, S. Tasker, S. Belák, A. Lloret, C. Boucraut-Baralon, H. F. Egberink, M. G. Pennisi, U. Truyen, T. Frymus, E. Thiry, F. Marsilio, D. Addie, M. Hochleithner, F. Tkalec, Z. Vizi, A. Brunetti, B. Georgiev, L. F. Ludwig-Begall, F. Tschuor, C. T. Mooney, C. Eliasson, J. Orro, H. Johansen, K. Juuti, I. Krampl, K. Kovalenko, J. Šengaut, C. Sobral, P. Borska, S. Kovaříková and R. Hofmann-Lehmann (2019). "Pan-European Study on the Prevalence of the Feline Leukaemia Virus Infection - Reported by the European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD Europe)." *Viruses* 11(11).
- Tablin, F., J. D. Johnsrude and N. J. Walker (2001). "Evaluation of glycoprotein Ib expression on feline platelets." *Am J Vet Res* 62(2): 195-201.
- Torre-Fuentes, L., L. Moreno-Jiménez, V. Pytel, J. A. Matías-Guiu, U. Gómez-Pinedo and J. Matías-Guiu (2020). "Experimental models of demyelination and remyelination." *Neurologia (Engl Ed)* 35(1): 32-39.
- Torres-Torrillas, M., E. Damiá, J. J. Cerón, J. M. Carrillo, P. Peláez, L. Miguel, A. Del Romero, M. Rubio and J. J. Sopena (2021). "Treating Full Depth Cartilage Defects with Intraosseous Infiltration of Plasma Rich in Growth Factors: An Experimental Study in Rabbits." *Cartilage* 13(2_suppl): 766S-773S.
- Torres-Torrillas, M., E. Damiá, P. Peláez, L. Miguel-Pastor, B. Cuervo, J. J. Cerón, J. M. Carrillo, M. Rubio and J. J. Sopena (2022). "Intra-osseous infiltration of adipose mesenchymal stromal cells and plasma rich in growth factors to treat acute full depth cartilage defects in a rabbit model: Serum osteoarthritis biomarkers and macroscopical assessment." *Front Vet Sci* 9: 1057079.

- Torricelli, P., M. Fini, G. Filardo, M. Tschon, M. Pischedda, A. Pacorini, E. Kon and R. Giardino (2011). "Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses." *Int Orthop* 35(10): 1569-1576.
- Torten, M., M. Franchini, J. E. Barlough, J. W. George, E. Mozes, H. Lutz and N. C. Pedersen (1991). "Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus." *J Virol* 65(5): 2225-2230.
- Trejo, J. L., J. Piriz, M. V. Llorens-Martin, A. M. Fernandez, M. Bolós, D. LeRoith, A. Nuñez and I. Torres-Aleman (2007). "Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects." *Mol Psychiatry* 12(12): 1118-1128.
- Tvedten, H. W., J. Ljusner and I. E. Lilliehöök (2013). "Enumeration of feline platelets in ethylenediamine tetra-acetic acid anticoagulated blood with the ADVIA 2120 system and two manual methods: Leucoplate and Thrombo-TIC." *J Vet Diagn Invest* 25(4): 493-497.
- Vagdatli, E., E. Gounari, E. Lazaridou, E. Katsibourlia, F. Tsikopoulou and I. Labrianou (2010). "Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation." *Hippokratia* 14(1): 28-32.
- Van den Ouweland, A. M., J. J. Van Groningen, J. A. Schalken, H. W. Van Neck, H. P. Bloemers and W. J. Van de Ven (1987). "Genetic organization of the c-sis transcription unit." *Nucleic Acids Res* 15(3): 959-970.
- Vaquerizo, V., S. Padilla, J. J. Aguirre, L. Begoña, G. Orive and E. Anitua (2018). "Two cycles of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) intra-articular injections improve stiffness and activities of daily living but not pain compared to one cycle on patients with symptomatic knee osteoarthritis." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 26(9): 2615-2621.
- Vasconcelos, E., A. C. Figueiredo and J. Seghatchian (2003). "Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and Apheresis." *Transfus Apher Sci* 29(1): 13-16.
- Vikjaer, D., S. Blom, E. Hjørting-Hansen and E. M. Pinholt (1997). "Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits." *Eur J Oral Sci* 105(1): 59-66.
- Vilar, J. M., M. Morales, A. Santana, G. Spinella, M. Rubio, B. Cuervo, R. Cugat and J. M. Carrillo (2013). "Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs." *BMC Vet Res* 9: 131.
- Villanueva-Saz, S., J. Giner, A. P. Tobajas, M. D. Pérez, A. M. González-Ramírez, J. Macías-León, A. González, M. Verde, A. Yzuel, R. Hurtado-Guerrero, J. Pardo, L. Santiago, J. R. Paño-Pardo, H. Ruíz, D. M. Lacasta, L. Sánchez, D. Marteles, A. P. Gracia and A. Fernández (2022). "Serological evidence of SARS-CoV-2 and co-infections in stray cats in Spain." *Transbound Emerg Dis* 69(3): 1056-1064.
- Vincent, J. L., A. Yagushi and O. Pradier (2002). "Platelet function in sepsis." *Crit Care Med* 30(5 Suppl): S313-317.
- Wang Saegusa, A. (2017). *Aplicación del plasma rico en plaquetas antólogo en el tratamiento de heridas como coadyuvante a terapias conservadoras en la especie cunícula. Efectos a corto y medio plazo.* Universidad CEU-Cardenal Herrera.
- Wasterline, A. S., H. Braun and J. L. Dragoon (2012). "Contents and formulations of platelet-rich plasma." *22(1): 33-42.*
- Weibrich, G., W. K. Kleis, R. Buch, W. E. Hitzler and G. Hafner (2003). "The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schütze platelet-rich plasma kit." *Clin Oral Implants Res* 14(2): 233-239.
- Weibrich, G., W. K. Kleis, G. Hafner and W. E. Hitzler (2002). "Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count." *J Craniomaxillofac Surg* 30(2): 97-102.
- Weibrich, G., W. K. Kleis, W. E. Hitzler and G. Hafner (2005). "Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report." *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(1): 118-123.
- Weiser, M. G. and G. J. Kociba (1984). "Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats." *Am J Vet Res* 45(3): 518-522.
- Westman, M., J. Norris, R. Malik, R. Hofmann-Lehmann, A. Harvey, A. McLuckie, M. Perkins, D. Schofield, A. Marcus, M. McDonald, M. Ward, E. Hall, P. Sheehy and M. Hosie (2019). "The

- Diagnosis of Feline Leukaemia Virus (FeLV) Infection in Owned and Group-Housed Rescue Cats in Australia." *Viruses* 11(6).
- Westman, M. E., S. J. Coggins, M. van Dorsselaer, J. M. Norris, R. A. Squires, M. Thompson and R. Malik (2022). "Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic pet cats in Australia and New Zealand: Guidelines for diagnosis, prevention and management." *Aust Vet J* 100(8): 345-359.
 - Westman, M. E., A. Paul, R. Malik, P. McDonagh, M. P. Ward, E. Hall and J. M. Norris (2016). "Seroprevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in Australia: risk factors for infection and geographical influences (2011-2013)." *JFMS Open Rep* 2(1): 2055116916646388.
 - Weyrich, A. S. and G. A. Zimmerman (2004). "Platelets: signaling cells in the immune continuum." *Trends Immunol* 25(9): 489-495.
 - Whitman, D. H., R. L. Berry and D. M. Green (1997). "Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery." *J Oral Maxillofac Surg* 55(11): 1294-1299.
 - Wu, B., G. Mottola, M. Schaller, G. R. Upchurch and M. S. Conte (2017). "Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications." *Mol Aspects Med* 58: 72-82.
 - Wu, Y., P. Chen, H. F. Huang, M. J. Huang and Y. Z. Chen (2012). "Reduction of transforming growth factor- β 1 expression in leukemia and its possible role in leukemia development." *Leuk Lymphoma* 53(1): 145-151.
 - Xue, M. and C. J. Jackson (2015). "Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring." *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4(3): 119-136.
 - Yamamoto, J. K., H. Hansen, E. W. Ho, T. Y. Morishita, T. Okuda, T. R. Sawa, R. M. Nakamura and N. C. Pedersen (1989). "Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission." *J Am Vet Med Assoc* 194(2): 213-220.
 - Yang, L. C., S. W. Hu, M. Yan, J. J. Yang, S. H. Tsou and Y. Y. Lin (2015). "Antimicrobial activity of platelet-rich plasma and other plasma preparations against periodontal pathogens." *J Periodontol* 86(2): 310-318.
 - Zelmanovic, D. and E. J. Hetherington (1998). "Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state." *Vet Clin Pathol* 27(1): 2-9.
 - Zhou, Y. and J. H. Wang (2016). "PRP Treatment Efficacy for Tendinopathy: A Review of Basic Science Studies." *Biomed Res Int* 2016: 9103792.
 - Zimmermann, R., R. Jakubietz, M. Jakubietz, E. Strasser, A. Schlegel, J. Wiltfang and R. Eckstein (2001). "Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application." *Transfusion* 41(10): 1217-1224.

Anexos

Protocolo de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en el Gato (*Felis silvestris catus*) y su Relación con Enfermedades Víricas Felinas (Leucemia e Inmunodeficiencia)

Artículos Publicados

Anexo 1. Evaluation of a Standardized Protocol for Plasma Rich in Growth Factors Obtention in Cats: A Prospective Study.

Miguel-Pastor L, Satué K, Chicharro D, Torres-Torrillas M, Del Romero A, Peláez P, Carrillo JM, Cuervo B, Sopena JJ, Cerón JJ, Rubio M. Front Vet Sci. 2022 Apr 14;9:866547. doi: 10.3389/fvets.2022.866547. eCollection 2022.

Anexo 2. Evaluation of Platelet-Rich Plasma by means of PRGF®-Endoret® protocol in leukemia cats: PDGF-BB and TGF-β1 valuation.

Miguel-Pastor L, Satué K, Chicharro D, Peláez P, Torres-Torrillas M, Carrillo JM, Cerón JJ, Sopena JJ, Rubio M. Front Vet Sci. 2023 Jan 26;10:1110055. doi: 10.3389/fvets.2023.1110055. eCollection 2023.

Anexo 1.



Evaluation of a Standardized Protocol for Plasma Rich in Growth Factors Obtention in Cats: A Prospective Study

Laura Miguel-Pastor¹, Katy Satué¹, Deborah Chicharro¹, Marta Torres-Torrillas¹, Ayla del Romero¹, Pau Peláez¹, José M. Carrillo^{1,2}, Belén Cuervo¹, Joaquín J. Sopena^{1,2*}, José J. Cerón³ and Mónica Rubio^{1,2}

¹ Bioregenerative Medicine and Applied Surgery Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain, ² García Cugat Foundation CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain, ³ Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis, University of Murcia, Murcia, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Fausto Cremonesi,
University of Milan, Italy

Reviewed by:

Ronaldo Jose Farias Correa Do
Amaral,
Federal University of Rio de
Janeiro, Brazil
Jeff Norris,
Midwestern University, United States

*Correspondence:

Joaquín J. Sopena
jsopena@uchceu.es

Specialty section:

This article was submitted to
Veterinary Regenerative Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 31 January 2022

Accepted: 24 March 2022

Published: 14 April 2022

Citation:

Miguel-Pastor L, Satué K,
Chicharro D, Torres-Torrillas M, del
Romero A, Peláez P, Carrillo JM,
Cuervo B, Sopena JJ, Cerón JJ and
Rubio M (2022) Evaluation of a
Standardized Protocol for Plasma
Rich in Growth Factors Obtention in
Cats: A Prospective Study.
Front. Vet. Sci. 9:866547.
doi: 10.3389/fvets.2022.866547

Introduction: Platelet-rich plasma (PRP) is an autologous plasma with platelet (PLT) concentration above that of whole blood (WB). PLTs contain growth factors (GFs) that promote tissular repair.

Objectives: To determine and compare the concentrations of PLT, red blood cells (RBC) and white blood cells (WBC) between WB samples, PRP and platelet poor plasma (PPP) samples; and to analyze the concentrations of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in the PRP and PPP of healthy adult cats using a standardized protocol with PRGF®-Endoret® characteristics.

Material and Methods: WB was collected from 30 cats. PRP was obtained following three centrifugation protocols using PRGF®-Endoret® technology: 255, 260, and 265 g for 10 min each. The cellular components, RBC, WBC, PLT, and the concentrations of PDGF-BB and TGF- β 1 in the PRP and PPP fractions were determined for each protocol.

Results: PLTs in the PRP fraction were statistically higher than WB, with no statistical differences between PPP and WB. In PRP fraction, PLT concentration was increased 1.4 times on average at 255 g; 1.3 times at 260 g and, 1.5 times at 265 g without statistical differences among them. The mean platelet volume (MPV) was significantly higher in WB compared to PRP and PPP fractions without significant differences between protocols. Compared to WB, the number of RBCs and WBCs was reduced by 99% and by more than 95% in PRP and PPP respectively, without significant differences between protocols. PDGF-BB concentrations were statistically higher in PRP than in PPP fractions, however, TGF- β 1 concentrations did not vary between fractions at 260 g. Comparing the three protocols within PRP and PPP fractions, no differences in PDGF-BB and TGF- β 1 concentrations were observed.

Clinical Relevance: The study shows scientific evidence regarding the obtention of PRP in cats using the PRGF®-Endoret® technology for the quantification of PDGF-BB and TGF- β 1. At 265 g for 10 min, PLT concentration was increased 1.5 times with

unnoticeable erythrocytes and leukocytes in the samples. These results clearly show that the PRGF®-Endoret® methodology is suitable to obtain PRP in cats. Further studies are needed to determine the clinical efficacy of the obtained PRGF in the treatment of different pathologies in cats.

Keywords: cat, platelet count, Platelet-Rich Plasma, platelet-derived growth factor BB, transforming growth factor β 1, PRGF®

INTRODUCTION

Platelet-Rich Plasma (PRP) is the fraction of autologous plasma that contains a platelet (PLT) concentration above baseline (1). PLT α -granules contain active substances such as chemokines, cytokines, and growth factors (GFs) among others. GFs include platelet-derived growth factor (PDGF, A-B-C), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), epithelial growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF) and connective tissue growth factor (CTGF). Therefore, PLTs are an important reservoir of GFs, which are biologically active polypeptides involved in chemotaxis, migration, cell proliferation and differentiation, angiogenesis, and extracellular matrix synthesis (2–7). Additionally, it has been demonstrated that PLTs are able to recruit, stimulate, and provide a scaffold for stem cells, which supports the use of GFs together with stem cells to prompt tissue regeneration and repair processes, as previously reported in dogs by this same research group (8–10). PRP therapy has its bases in the role that platelet growth factors (PGFs) play during the three phases of wound healing and repair cascade: inflammation, proliferation, and remodeling (11).

Currently, there is a wide variety of scientific evidence showing promising results on the use of autologous PRP in canine and equine species to treat some orthopedic pathologies (8, 10, 12–15). PRP and PRGF are both plasma derivatives; PRP is a PLT concentrate with no red blood cells (RBC) present in it, while PRGF is a subtype of PRP characterized by a moderate PLT concentration and the absence of leukocytes (WBC). Compared to PRP, PRGF prevents the proinflammatory effects of proteases and acid hydrolases contained in WBC, reducing the side effects of these cells such as pain, and inflammation. Moreover, PRGF is a 100% autologous and biocompatible preparation elaborated by a single centrifugation process (16–19). The literature regarding the obtention and clinical use of PRP in cats is very scarce, and, no PRGF study has been reported in cats, thus further studies for standardization and validation of PRP and PRGFs protocols are necessary in this species (20–22).

There is not a standardized protocol for PRP obtention, thus, the composition of different PLT derivatives vary greatly in PLT, WBC and RBC content. Moreover, the concentration of GFs and fibrin, led to a tremendous variety of PRP-like products that are described by different terminologies and abbreviations (11, 23, 24). The classification of these products is based on the type of activation, PLT and GFs concentration, and the presence or absence of WBC or fibrin (25, 26). Based on the fibrin

architecture and cell content, PLT products are classified into four main families: Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP), such as the Plasma Rich in Growth Factors Endoret (PRGF®-Endoret®) technique; Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma (LR-PRP), such as Biomet GPS system; Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF), such as Fibrinet; Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF), such as Intra-Spin L-PRF. All these products present different biological properties and mechanisms of action, as well as different clinical indications (27). Revisions to terminology and new classification criteria are still evolving today (11).

Furthermore, the ideal PLT concentration and leukocyte types are still being discussed (11). PRGF®-Endoret® Technology from BTI Biotechnology Institute has provided precise technology to obtain this PRGF and several studies had assessed its clinical use in wound healing, tissue regeneration in oral implantology, orthopedics and sports medicine, as well as treatment of corneal ulcers, among other studies (28, 29). The main characteristics of the PRGF®-Endoret® are the use of a single centrifugation and the extremely decrease of WBC and RBC. This technology diminishes the proinflammatory activity (29). Even though the collection system is similar for all species, different centrifugation protocols have been described for each species. The differences between platelet's sizes and the tendency to pseudothrombocytopenia in cats make it necessary to standardize a specific blood centrifugation protocol for PRP obtention in cats (22, 23, 30).

There is currently no commercialized PRP system for cats and PRP obtention protocols for this species is still far from being standardized and the optimal characteristics compatible with PRGF®-Endoret® suitable for clinical application in feline medicine have not been achieved (21, 22, 31, 32). In other species such as rabbits and dogs, the mean PLT enrichment of PRP Endoret® preparations was \sim 1.5 times higher than that of WB (33, 34). Silva et al. obtained a PLTs concentrate (PC) with significantly higher amounts of GFs compared to plasma, but RBC and WBC were present on it. That indicates that PC can be experimentally used in feline medicine (20). In addition, a study published by the Clinical Hospital of the University of Padua (Italy) showed wound healing in a cat using canine PRP (35). Moreover, two recent articles describe the use of a platelet-rich fibrin matrix in the resolution of an oronasal fistula (36) and the application of PRP in a cutaneous wound secondary to mammary gland tumor removal with satisfactory results (37). In addition, plasma-rich fibrin (PRF), a second-generation PC used to regenerate tissues and promote early healing without risk of infection, has been identified and proposed to treat different conditions in cats (38). Compared to PRP and PRGF,

PRF are preparations with a high-density fibrin network. Per definition, these products only exist in a strongly activated gel form and cannot be injected or used like traditional fibrin glues. Furthermore, because of their strong fibrin matrix, they can be handled like a solid material for other applications (27). Since PRP therapy offers enormous potential as an alternative treatment for degenerative diseases and tissue regeneration, more studies are needed to evaluate the clinical efficacy of PRP use in cats (20–22, 31, 39). Even though there are some reports of the application of PRF in cats, and several surgical conditions involving skin, soft tissues, and orthopedics would also justify the use of these products (40).

We hypothesize that P-PRP can be obtained in cats using PRGF®-Endoret® technology. Therefore, the purposes of this study were (I) to determine and compare the concentrations of PLT, RBC and WBC between samples of WB and in the PRP and PPP fractions and (II) to analyze the concentrations of PDGF-BB and TGF- β 1 in PRP and PPP fraction in healthy adult cats using a standardized protocol with PRGF®-Endoret® characteristics: moderately PC and to avoid WBC and RBC employing a single centrifugation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

This clinical study was assessed and approved by the CEU Cardenal Herrera University Committee of Ethics in Animal Research and by the relevant regional authorities (code: 2018/VSC/PEA/0196) according to the Spanish Policy for Animal Protection (RD53/2013), which complies with European Union Directive 2010/63/UE.

A prospective study was performed from March 2019 to December 2021 in the Veterinary Hospital of the Cardenal Herrera-CEU University. A total of 30 domestic and non-pedigree healthy cats were included in the study. Cats came to our hospital for a routine medical check-up, an informed consent was signed by cats' owners to participate in the study. Inclusion criteria for this study was the following: all cats were tested by the commercially available combined enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for FIV antibody and FeLV p27 antigen (Idexx SNAP Combo FeLV Ag/FIV antibody test) providing negative results. A complete blood count and plasma biochemistry were performed for each animal, reporting results within the reference range values for the feline species. None of the animals received medical treatment during the last 6 months prior to the study. Each patient was monitored by a veterinarian during the development of the procedure. Animals receiving treatment during the previous six months or currently, presence of diseases or testing positive for FeLV or FIV were excluded from the study.

Blood Collection

In order to ensure correct sampling, blood collection was carried out under sedation using a combination of intramuscular butorphanol (0.3 mg/kg), dexmedetomidine (12 μ g/kg) and alfaxalone (0.8 mg/kg). After sedation, the cephalic vein was catheterized using a 22 G catheter to collect 0.5 ml of blood which

were immediately transferred to 0.5 ml tube containing K₃-EDTA (BD Vacutainer; Becton, Dickinson) for blood count as a WB. Thereafter, a total of 27 ml of blood were collected from the jugular vein under sterile conditions in three vacutainer sodium citrate 3.8% tubes (Blood-Collecting Tubes®, BTI Biotechnology Institute, Alava, Spain), 9 ml in each tube, and subsequent analysis of GFs was carried out. Less than 10% of the total blood volume was collected in each patient and after blood collection, every cat received 27 ml of acetated Ringer's solution IV during the first 30 min to restore the vascular volume and to prevent complications such as hypotension or hypovolemia.

Preparation of Platelet Rich Plasma

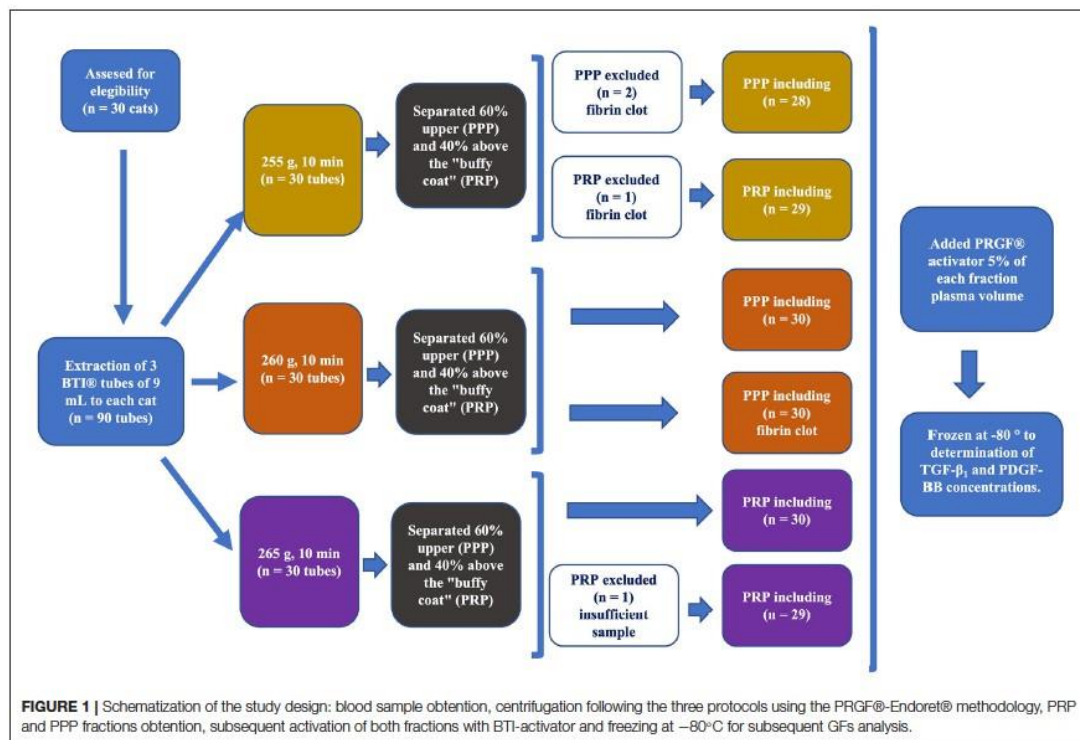
Figure 1 shows the procedure for PRP obtention using the PRGF®-Endoret® methodology followed in the study. The PRP was prepared according to the PRGF®-Endoret® methodology (41–43). Samples collected in sodium citrate tubes were immediately centrifuged at room temperature in a PRGF®-Endoret® System IV centrifuge (BTI Biotechnology Institute S.L.) following three different centrifugation protocols: 255 g x 10 min, 260 g x 10 min and 265 g x 10 min. After blood centrifugation three layers are obtained: RBCs, the "buffy coat," and the plasma. The plasma was separated into two fractions: the PPP fraction was the upper 60% and was pipetted, and the PRP fraction, equivalent to the 40% of the plasma, is located just above the "buffy coat" and was also pipetted. The plasma pipetting and blood collection procedure were carried out under maximum sterile conditions with a laminar flow hood and always by the same researcher. The samples were transferred to individual fractionation tubes with no additive (PRGF® fractionation tubes, BTI, Biotechnology Institute, Alava, Spain). Subsequently, PRP and PPP were activated by adding calcium gluconate 10% (PRGF® activator, BioTechnology Institute, Alava, Spain) (5% of the plasma volume) to achieve PLT degranulation and GFs release obtaining PRGF. The samples obtained were aliquoted into eppendorf tubes and immediately after activation were frozen at -80°C before the PLT plug was formed after PLT activation for subsequent determination of TGF- β 1 and PDGF-BB concentrations.

Hematological Analysis

Red blood cell (RBC; M/ μ L), white blood cell (WBC; K/ μ L), platelets (PLT; K/ μ L) and mean platelet volume (MPV; fL) count were determined in WB, PPP and PRP using an automated hematology analyzer (Advia® 2120i Siemens Healthcare Diagnostics Inc.). The absolute numbers of PLTs obtained by ADVIA were verified in blood smears always by the same clinical pathologist.

Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) and Transforming Growth Factor- β 1 Quantification (TGF- β 1)

TGF- β 1 and PDGF-BB were measured after activation in both PPP and PRP fractions to assess the effect of the centrifugation in PLTs and associated GFs. TGF- β 1 and



PDGF-BB were measured using ELISA kits (Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA de R&D Systems DY240-05 and Human PDGF-BB DuoSet ELISA de R&D Systems DY220, respectively) according to manufacturer's instructions. These GFs were determined using human antibodies because these kits have been used for the same purposes in other feline PC studies (20, 44) since it has been reported that human and cat PDGF-BB present high peptide sequence homology (45).

Statistical Methods

The data were processed using the SPSS 20.0 program for Windows (SPSS® Inc., Chicago, USA).

A descriptive study of the mean, standard deviation and confidence intervals were made for each variable. A value of $p < 0.05$ was considered significant. Normality of data was tested in every quantitative variable with Shapiro-Wilk test and variance homogeneity with Levene test. ANOVA tests with a *post-hoc* Tukey test was used to compare normally distributed variables, while Non-parametric Kruskal-Wallis tests was used to compare the variables which did not follow a normal distribution. Correlations between variables were assessed using a Pearson correlation test.

RESULTS

Blood samples were drawn from a total of 30 healthy, neutered adult cats, 21 males and nine females. The mean age was 5.3 years old (range 2.7–7.9 years old) and the mean weight was 6.0 kg (range 4.87–7.13 kg).

Table 1 shows PLT concentration, MPV, number of RBC and WBC and the concentrations of PDGF-BB and TGF- β 1 in both PRP and PPP according to the three centrifugation protocols used in the study.

Platelet Concentration and Mean Platelet Volume

The mean number of PLT was statistically higher in the PRP fraction than in WB ($p = 0.026$). The mean value of PLT in PRP fraction when centrifuging the samples at 255 g was 462.1 ± 277.9 , 426.0 ± 307.2 K/ul at 260 g, and higher when using 265 g (481.4 ± 275.0 K/ul). In the PRP fraction, PLT concentration was increased 1.4 times on average at 255 g; 1.3 times on average at 260 g, and 1.5 times on average at 265 g. There were no statistical differences between the PPP and WB fraction. Using the centrifugation protocol at 255 g x 10 min, the number of PLT in the PRP fraction reached a mean value 1.5 times higher than the WB one in 14 (46.7%), 0.5 to 1.5 times in 10 (33.3%) and in

TABLE 1 | Mean \pm SD of platelet (PLT) concentrations, mean platelet volume (MPV), erythrocytes (RBCs) and leukocytes (WBCs) concentrations in whole blood samples (WB) and in the PRP and PPP fractions; platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) concentrations in the PRP and PPP fractions in 30 cats ($n = 30$).

	Centrifugation protocol						
	WB	255 g x 10 min		260 g x 10 min		265 g x 10 min	
		PRP	PPP	PRP	PPP	PRP	PPP
PLT (K/ μ L)	328.5 \pm 155.8	462.1 \pm 277.9	293.5 \pm 179.1	426.0 \pm 307.2	300.8 \pm 180.7	481.4 \pm 275.0	293.3 \pm 161.4
MPV (fL)	16.3 \pm 5.0	11.8 \pm 1.9	11.25 \pm 1.7	11.9 \pm 2.6	11.3 \pm 1.6	12.3 \pm 2.5	11.4 \pm 1.8
RBC (M/ μ L)	7.65 \pm 1.23	0.07 \pm 0.06	0.05 \pm 0.056	0.07 \pm 0.04	0.04 \pm 0.02	0.07 \pm 0.05	0.04 \pm 0.021
WBC (K/ μ L)	9.46 \pm 3.18	0.35 \pm 0.45	0.17 \pm 0.203	0.28 \pm 0.26	0.15 \pm 0.14	0.27 \pm 0.28	0.12 \pm 0.12
PDGF-BB (pg/ml)		1281.9 \pm 1110.5	649.6 \pm 596.8	1271.8 \pm 965.7	559.9 \pm 462.5	1346.6 \pm 1197.8	616.6 \pm 556.6
TGF- β 1 (pg/ml)		17450.3 \pm 10105.3	12441.1 \pm 5165.9	14193.9 \pm 7705.7	12499.1 \pm 4962.9	17085.9 \pm 7988.9	12404.1 \pm 4539.6

<0.5 times in 6 (20%) of the samples analyzed. Compared with WB, the centrifugation protocol at 260 g x 10 min, the number of PLT in the PRP fraction increased more than 1.5 times in 11 (38%), from 0.5 to 1.5 times in 11 (38%) and in <0.5 times in 7 (24%) of the samples analyzed. By means of centrifugation protocol at 265 g x 10 min, the mean number of PLT increased more than 1.5 times in 13 (43.3%), from 0.5 to 1.5 in 14 (46.6%) and in <0.5 times in 3 (10%) of the samples analyzed. However, PLT concentrations did not differ significantly between the three protocols (Table 1; Figure 2).

A total of 206 samples were analyzed and PLT aggregates were obtained in 8 WB samples and 6 PRP samples. According to ADVIA 2120i (46) criteria, and the number of PLT aggregates in the smears, 13 out of the 14 samples, showed from 1 to 7 PLT aggregates with more than 10 PLTs each, while the remaining sample showed more than 50 PLTs almost in every PLT aggregate. Due to severe clustering after centrifugation, 2 PRP and 2 PPP samples were not included in the study.

The mean platelet volume (MPV) was statistically higher in WB than in PRP and PPP fractions ($p < 0.001$) without significant differences between protocols nor fractions (Table 1). MPV was positively correlated with the presence of PLT aggregates ($r = 0.559$, $p < 0.001$).

Erythrocyte Concentration

Even though, the mean number of RBCs was statistically higher in WB than in the PRP and PPP fractions ($p < 0.001$), no significant differences were identified in relation to this parameter between both fractions. Compared to the initial value, the number of RBCs was reduced by 99% in all the analyzed samples, with no statistically significant differences between the three centrifugation protocols used in the study (Table 1).

Leukocyte Concentration

The mean number of WBC was statistically higher in the WB samples than in the PRP and PPP fractions ($p < 0.001$), with no differences between them. Compared to the initial value, the number of WBC decreased more than 95% in the PRP and PPP fractions, without significant differences between protocols (Table 1).

Platelet-Derived Growth Factor BB (PDGF-BB) Concentrations

The mean concentrations of PDGF-BB in the PRP fraction (1281.9 \pm 1110.5, 1271.8 \pm 965.7 and 1346.6 \pm 1197.8 pg/ml) were statistically higher than those of the PPP fraction (649.6 \pm 596.8 pg/ml, 559.9 \pm 462.5 and 616.6 \pm 556.6 pg/ml) ($p < 0.001$). The analysis of variation did not reveal statistically significant differences in the concentrations of PDGF-BB according to the centrifugation protocols used in the study (Table 1; Figure 3). The presence of PLT aggregates did not affect PDGF-BB concentrations in the PRP fractions.

Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) Concentrations

The mean concentrations of TGF- β 1 in the PRP fraction (17450.3 \pm 10105.3 and 17085.9 \pm 7988.9 pg/ml) were statistically higher than those of PPP fraction (12441.1 \pm 5165.9 and 12404.1 \pm 4539.6 pg/ml) when centrifugation protocols at 255 g ($p = 0.017$) and 265 g ($p = 0.002$) were used. No significant differences were detected in TGF- β 1 concentrations among centrifugation protocols. The presence of aggregates also did not affect TGF- β 1 concentrations in the PRP fractions (Figure 4).

DISCUSSION

According to our hypothesis the mean PLT enrichment in the PRP fraction of the Endoret® preparations was 1.5 times higher (147%) than in WB at 265 g x 10 min, with proportions of 140% and 130% for 255 g x 10 min and 260 g x 10 min, respectively. In a similar way to what happens in other species such as rabbits and dogs (33, 34), the commercial system used in this study (PRGF®-Endoret®) increases the concentration of PLTs at least 1.5 times compared to baseline. The centrifugation protocols used in these studies yielded a mean PLTs concentration >300,000 plt/L, which is the minimum concentration required for a quality concentrate (47). However, some authors have described more moderate ranges of PLTs (1.5 to 2 times or 1.3 to 4 for WB) to provide greater clinical benefit in humans (48–51). It is documented that the protocols for PRP obtention show variations in the concentrations of PLTs, RBCs and WBCs among them for a specific species (52–54). In the same way, a validated protocol for

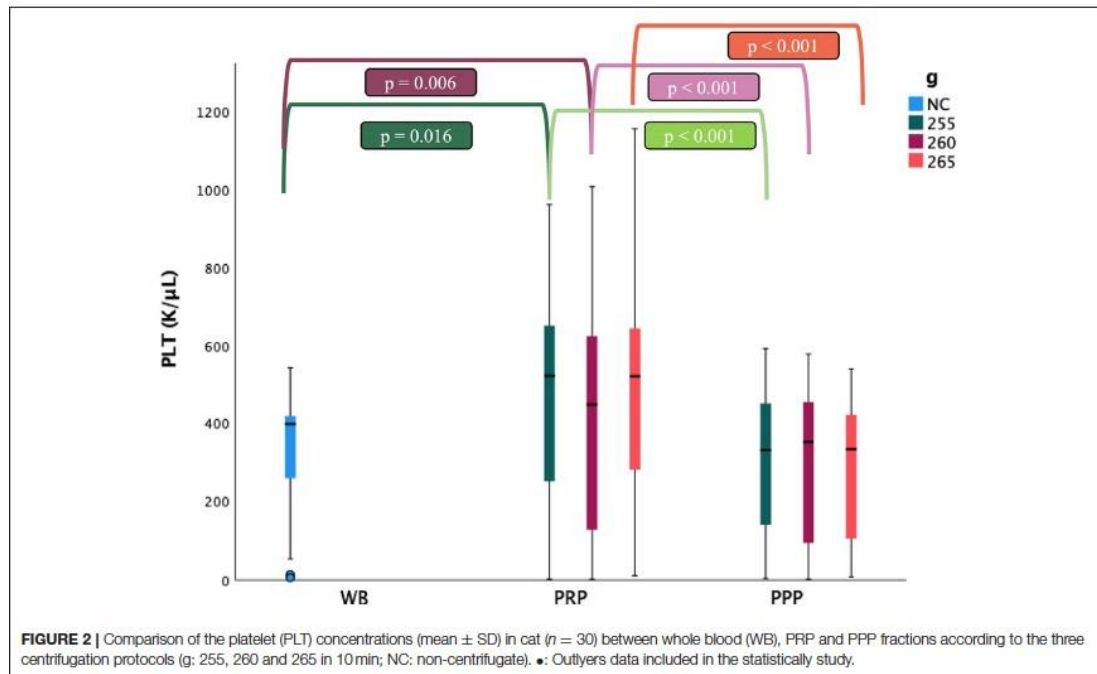


FIGURE 2 | Comparison of the platelet (PLT) concentrations (mean ± SD) in cat (*n* = 30) between whole blood (WB), PRP and PPP fractions according to the three centrifugation protocols (g: 255, 260 and 265 in 10 min; NC: non-centrifugate). •: Outliers data included in the statistically study.

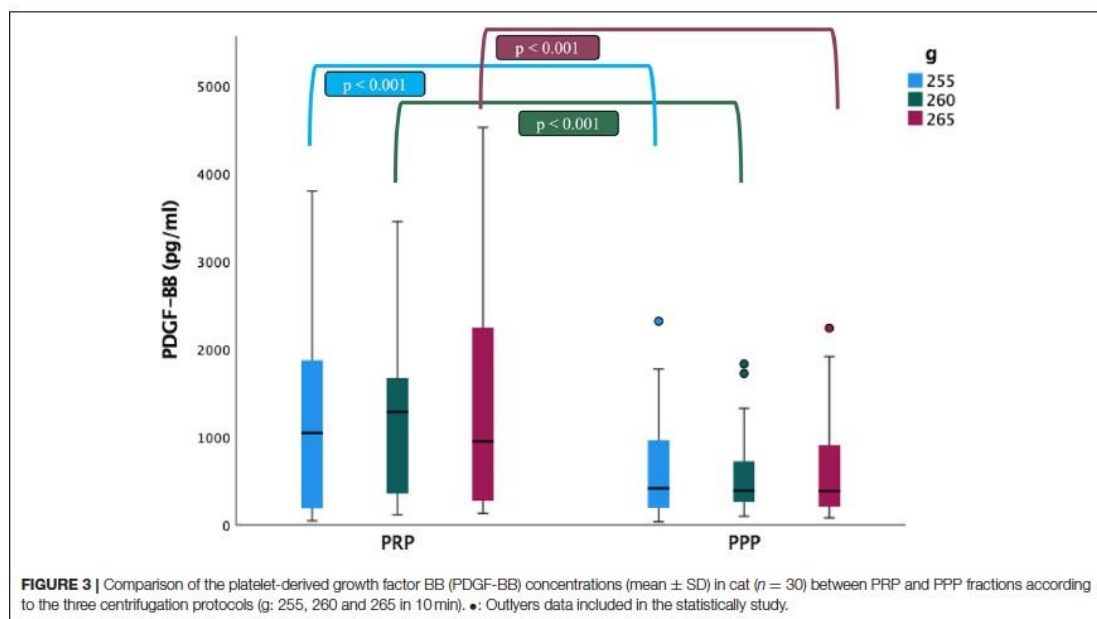
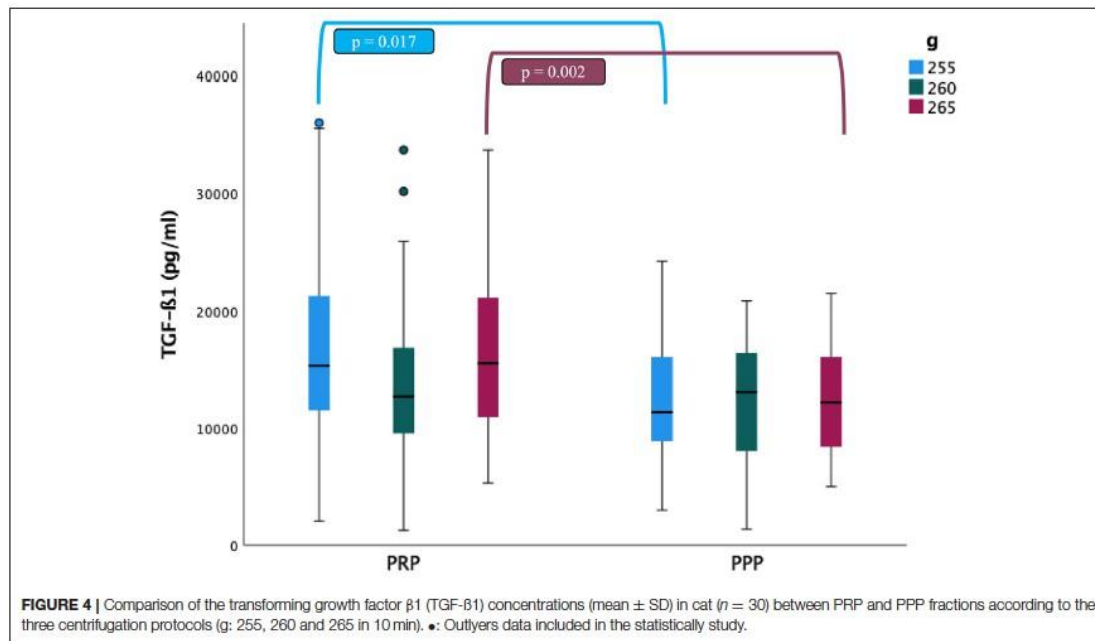


FIGURE 3 | Comparison of the platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) concentrations (mean ± SD) in cat (*n* = 30) between PRP and PPP fractions according to the three centrifugation protocols (g: 255, 260 and 265 in 10 min). •: Outliers data included in the statistically study.

a specific species may not produce the same cellular composition in any other species (22, 55). In other study, Boswell et al. affirmed that some individuals cannot concentrate platelets with a specific

system, but contrarily, they are able to concentrate platelets successfully when using a system from a different manufacturer. This indicates that failure to generate PRP is possible in every



individual and when using any system, therefore, it has been suggested that a complete blood count should be performed on each patient's venous blood and PRP, so the clinician can ensure that the patient is being treated with PRP (56). We have not obtained uniform results in all samples analyzed in our study due to individual characteristics and variability, as reported in previous studies.

The existing literature on PC in cats is scarce. In addition, there are no specific data on the exact range of PLTs required in a clot to be considered PRP in this species. In fact, although several commercial centrifugation methods showed increases in PLT between 151 and 187% (20–22) with respect to WB, they did not obtain PLT concentrations above the ideal range reported.

On the one hand, Silva et al. (20) collected WB samples cat in 8.5 mL tubes and after 6 min and 85 g centrifugation protocol obtained an 183% increase in PLT after spontaneous formation of the clot. Chun et al. (22) using WB volume of 12.5 mL, obtained PC by double centrifugation. After the first centrifugation at 3,600 rpm for 1 min, the plasma suspension was aspirated and centrifuged again at 3,800 rpm for 5 min, obtaining an increase in PLTs of 151%. On the other hand, Ferrari and Schwartz (21) compared two systems for obtaining PRP, using two volumes of 13.5 and 12.5 mL of WB. Although single centrifugation at 1,300 rpm for 5 min did not concentrate PLTs, double centrifugation at 3,600 rpm for 1 min and subsequently at 3,800 rpm for 5 min produced an increase in PLTs of 187% compared to the initial value (22, 55).

In our study, 9 mL tubes and a single centrifugation protocol were used, varying the force (255, 260, and 265 g) in a standard

time of 10 min. To the author's knowledge, the WB sample volume, the gravitational force, and the centrifugation times considered in the different protocols for PRP obtention, could be responsible for the variations observed between studies, since the basal numbers of PLTs in WB were very similar. However, some characteristics such as the model or diameter of the centrifuge and the gravitational force were not specified in these studies, therefore, the authors emphasize the importance of characterizing the PRP product generated in a specific species by a given system.

PLT aggregation in feline blood samples is common, with reported prevalence ranging between 40% and 70% (21, 57–60). In this study, PLT aggregation occurred in 27% of the WB samples and in 7% of the PRP samples, with no evidence of PLT aggregation in the PPP samples. PLT aggregation is suspected to be due to species-specific factors, the sample collection method, and the anticoagulation protocol (21).

Several factors in the cat may be specifically involved in promoting aggregation tendency such as increased serotonin concentration, irreversible aggregation and release of granules when exposed to serotonin and irreversible aggregation in response to low concentrations of ADP (61). The quality of blood collection has been postulated to be the main cause of the presence of PLT aggregates in feline blood samples (62). The presence of PLT aggregates in these blood samples could be related to the collection method, since the WB samples were obtained directly by catheterization of the cephalic vein using a 22G catheter, and it is well-known that vascular endothelial injury produced by venipuncture causes adherence of PLTs to

von Willebrand factor bound to subendothelial collagen with PLT GPIIb α receptors, inducing additional PLT recruitment (63).

On the other hand, baseline PLT counts in our study were performed using EDTA anticoagulated blood following the manufacturer's instructions. Although the nature of EDTA-induced pseudothrombocytopenia is still uncertain (64), it has been proposed that autoantibodies (IgG, IgM, and IgA) present in plasma recognize and bind to an epitope of glycoprotein IIb (GPIIb), which is part of the PLT surface GPIIb/IIIa complex, promoting PLT agglutination (65). PLT counts by ADVIA were reduced in samples with EDTA-induced pseudothrombocytopenia, whereas PLT aggregates were observed in blood smears. In fact, in 7 samples, from 1 to 7 groups with > 10 PLTs were identified and in 1 sample most of the cells were forming clusters of > 50 PLTs. This reduction in the number of baseline PLT in the samples with pseudothrombocytopenia using ADVIA could explain the wide range of variation experienced in our results since, like the rest of the samples, they were also included in the statistical study. Although the presence of pseudothrombocytopenia in our study was low, based on previous evidence, it seems that EDTA is not the appropriate anticoagulant for feline blood.

Currently, antiaggregants such as prostaglandin E1 (PGE1) and prostaglandin I2 (PGI2) (66) are used to prevent PLT aggregation in cats. Iloprost is a PGI2 analogous that inhibits the reactions induced by aggregating agents such as arachidonic acid, collagen or epinephrine (62). Since Iloprost does not influence cytological evaluations of blood smears or other hematological parameters, the addition of these substances to EDTA tubes is a good alternative to avoid PLT aggregation and increase the reliability of feline PLT counts.

Compared with previous results (20) in which MPV was lower in WB than in PC, MPV in WB in this study was significantly higher than in both PRP and PPP fractions regardless of the centrifugation protocol used. Certain factors such as the type of anticoagulant used, the time required to perform the analysis, and the methodology (67) could be some of the factors involved in these differences. Indeed, the MPV greatly depends on the measurement technique and on the duration and conditions of storage before the blood is tested. ADVIA is considered to have one of the best methods for the analysis of these cells as it identifies size, optical density and detects PLTs up to 60 fL (57). Feline blood can contain PLTs larger than 60 fL (66), so ADVIA may not detect them. This failure to detect larger PLTs may be the reason why the number of PLTs by ADVIA is falsely lower in some of the samples tested. The increases in MPV correlated with the decrease in the number of PLTs could indicate that these blood samples had larger PLTs (66). Regarding the type of anticoagulant, PLTs swell when stored in EDTA and, to a lesser extent, in solutions containing citrate, making the determination of MPV dependent on time (66).

Our study reported lower serum TGF- β 1 values than those previously reported by Arata et al. (44). However, both the serum concentrations of TGF- β 1 and those of PDGF-BB were higher in the present study than the concentration obtained in plasma by Silva et al. (20). Several factors such as the base fluid (plasma or serum), the sample volume and the PLT activation method

used could have conditioned the differences between the results obtained in the latest research (55). Serum differs from plasma in that most of the fibrinogen is converted into a fibrin clot in which PLTs can be attached to the fibrin matrix, activated to form aggregates or both (68). Based on these events, it has been postulated that PLTs in serum samples undergo premature activation compared to plasma samples, with the consequent release of GFs contained in the α -granules of PLTs (20). The concentration of PDGF was higher in PRP than in PPP fraction with all centrifugation protocols. However, TGF- β 1 was more concentrated in PRP than in PPP fraction when centrifugation protocols at 255 and 265 g were used. Further studies are needed to evaluate the temporal release kinetics after PLT activation and the distribution of GFs in PLT α -granules in cats. Conversely, a major finding of this study is an increased of PDGF-BB and TGF- β 1 in samples with PLT clumping with no significant differences to TGF- β 1. This suggests that pseudothrombocytopenia in cats does not affect the concentration of GFs such as PDGF-BB and TGF- β 1. Nevertheless, studies on PRP in cats are scarce, and further investigation is required to determine the optimal concentrations of GFs in PRP products in cats to achieve clinical efficacy in cats.

PRP has been of interest in the field of regenerative medicine due to the regenerative potential of its GFs (1). However, there is considerable variability in the platelets' gathering and the concentration of GFs within different PRP preparations. There are many PRP-purification systems commercially available (69), and prepared PRP varies in terms of PLT concentration, degree of WBC, RBC, and concentration of GFs (50). PRGF®-Endoret® technology is a type of PRP obtained from small volumes of blood through a single centrifugation process and subsequent fractionation of the plasma. This is important in cat practice because the volume of blood required to obtain PRP for clinical use could be a limiting factor due to the small size of this species. The volume of blood extracted in our study did not exceed the maximum volume of extraction allowed (21, 70) in any cat, thus guaranteeing correct volemia and perfusion. In addition, PRGF®-Endoret® technology is classified as P-PRP, is moderately enriched in PLTs, does not contain RBCs or WBCs, and its activation is performed with calcium chloride (29). These criteria are met in the 3 protocols used in our study, in which the presence of RBCs and WBCs was reduced to values close to zero. Similar results were shown by Ferrari and Schwartz (21) using a simple centrifugation system (1,300 rpm \times 5 min), however, when they used a double centrifugation system (3,600 rpm \times 1 min and 3,800 rpm \times 5 min), a 80% reduction in WBCs was reported, resulting in a PRP product characterized by the presence of WBCs. There are different PRP formulations according to the presence or absence of WBC: Leukocyte poor PRP (LP-PRP), P-PRP and LR-PRP (24, 71, 72). Taking this classification into account, the double centrifugation protocol used by Ferrari and Schwartz (21) provided a LP-PRP. Nevertheless, the presence or absence of WBCs in PRP is frequently discussed in the literature. WBC could be an additional source of GFs and antimicrobial properties (54, 73) but, in the other hand, WBC release proinflammatory cytokines that could prompt the inflammatory process and counteract the

positive effect on tissue regeneration (54, 71). Our study did not assess the clinical efficacy of PRGF products obtained, and it is unknown if these products with moderate PLT concentration and undetectable RBC and WBC would have applications *in vivo*. The versatility and biocompatibility of these products have stimulated their therapeutic use in numerous medical and scientific fields including dentistry, oral implantology, orthopedics, ulcer treatment, and tissue engineering among others. The use of PRGF in the treatment of osteoarthritis in dogs and rabbits (8, 10, 74), tendinopathies in horses (75–77) and sheep (78), wound healing in rabbits (9, 79) or corneal ulcer healing in different species (80, 81) is promising. Cats are susceptible to various musculoskeletal diseases and can also suffer traumatic damage (82), in addition, in recent years more orthopedic diseases have been identified in cats, especially osteoarthritis (22). It is reasonable to assume that PRGF therapy could be effective for feline patients in a similar way to what occurs in other animal species for the treatment of osteoarthritis, wound healing, and tendinopathies (21).

Future research is needed to evaluate the clinical efficacy of PRGF obtained by PRGF®-Endoret® technology in this species. The standardization and optimization of the PRGF obtained by means of this methodology would allow to formulate the preparations according to each specific pathology (29).

CONCLUSIONS

The BTI-Endoret® methodology allows to obtain unnoticeable RBC and WBC in the PRP fractions of healthy cats, so it could be considered P-PRP and centrifugation at 265 g for 10 min shows a mean PLT enrichment 1.5 times higher in Endoret® preparations than baseline. Moreover, even if no statistical differences have been observed between different protocols, when using 265 g for 10 min a higher PLT concentration and lower concentration of WBC were obtained. Following PRGF®-Endoret® technology greater values of PDGF-BB and TGF-β1 than in basal serum samples have been obtained in previous studies. Further studies are needed to determine the technique reproducibility and

validation and to evaluate safety and benefit degree for feline patients.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by CEU Cardenal Herrera University Committee of Ethics in Animal Research (code: 2018/VSC/PEA/0196). Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM-P performed the experiment, analyzed data, and wrote the manuscript. DC, MT-T, AR, PP, and BC participated in performing the experiment. LM-P and KS developed the first draft of the manuscript. JC, MR, and JS designed the study, supervised all procedures, and coordinated the research. MR and KS performed statistical analysis. JC analyzed blood samples. JS proofread the manuscript and gave final approval of the version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This research was funded by García Cugat Foundation CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery and the project INDI21/54 CEU-UCH.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Cátedra García Cugat for their technical support, veterinarians and collaborators at the Veterinary Hospital of CEU Cardenal Herrera University, and animal owner's for their generous participation in this study.

REFERENCES

- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* (2001) 10:225–8. doi: 10.1097/00008505-200110000-00002
- Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* (2011) 105 Suppl 1:S13–33. doi: 10.1160/THS10-11-0720
- Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* (2009) 23:177–89. doi: 10.1016/j.blre.2009.04.001
- Steed DL. The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am.* (1997) 77:575–86. doi: 10.1016/S0039-6109(05)0569-7
- Meseguer J, Esteban MA, Rodríguez A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microsc Res Tech.* (2002) 57:491–7. doi: 10.1002/jemt.10102
- Vincent JL, Yagushi A, Pradier O. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med.* (2002) 30(Suppl. 5):S313–7. doi: 10.1097/00003246-200205001-00022
- Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* (2002) 22:913–22. doi: 10.1089/10799900260286623
- Cuervo B, Rubio M, Sopena J, Dominguez JM, Vilar J, Morales M, et al. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci.* (2014) 15:13437–60. doi: 10.3390/ijms150813437
- Chicharro D, Carrillo JM, Rubio M, Cugat R, Cuervo B, Guil S, et al. Combined plasma rich in growth factors and adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the cutaneous wound healing in rabbits. *BMC Vet Res.* (2018) 14:288. doi: 10.1186/s12917-018-1577-y
- Vilar JM, Morales M, Santana A, Spinella G, Rubio M, Cuervo B, et al. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Vet Res.* (2013) 9:131. doi: 10.1186/1746-6148-9-131

11. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *Int J Mol Sci.* (2020) 21:7794. doi: 10.3390/ijms21207794
12. Silva RF, Carmona JU, Rezende CM. Intra-articular injections of autologous platelet concentrates in dogs with surgical reparation of cranial cruciate ligament rupture: a pilot study. *Vet Comp Orthop Traumatol.* (2013) 26:285–90. doi: 10.3415/VCOT-12-06-0075
13. Carmona JU, Rios DL, López C, Álvarez ME, Pérez JE, Bohórquez ME. *In vitro* effects of platelet-rich gel supernatants on histology and chondrocyte apoptosis scores, hyaluronan release and gene expression of equine cartilage explants challenged with lipopolysaccharide. *BMC Vet Res.* (2016) 12:135. doi: 10.1186/s12917-016-0759-8
14. Garbin LC, Olver CS. Platelet-rich products and their application to osteoarthritis. *J Equine Vet Sci.* (2020) 86:102820. doi: 10.1016/j.jevs.2019.102820
15. Angelone M, Conti V, Biacca C, Battaglia B, Pecorari L, Piana F, et al. The contribution of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma to the treatment of chronic equine laminitis: a proof of concept. *Int J Mol Sci.* (2017) 18:2122. doi: 10.3390/ijms18102122
16. Anitua E, Sánchez M, Orive G. The importance of understanding what is platelet-rich growth factor (PRGF) and what is not. *J Shoulder Elbow Surg.* (2011) 20:e23–4; author reply e4. doi: 10.1016/j.jse.2010.07.005
17. Nishiyama K, Okudera T, Watanabe T, Isobe K, Suzuki M, Masuki H, et al. Basic characteristics of plasma rich in growth factors (PRGF): blood cell components and biological effects. *Clin Exp Dent Res.* (2016) 2:96–103. doi: 10.1002/cre2.26
18. Wu PI, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-rich plasma. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* (2016) 27:825–53. doi: 10.1016/j.pmr.2016.06.002
19. Filardo G, Di Matteo B, Di Martino A, Merli ML, Cenacchi A, Fornasari P, et al. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections show no superiority versus viscosupplementation: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med.* (2015) 43:1575–82. doi: 10.1177/0363546515582027
20. Silva RF, Alvarez ME, Rios DL, López C, Carmona JU, Rezende CM. Evaluation of the effect of calcium gluconate and bovine thrombin on the temporal release of transforming growth factor beta 1 and platelet-derived growth factor isoform BB from feline platelet concentrates. *BMC Vet Res.* (2012) 8:212. doi: 10.1186/1746-6148-8-212
21. Ferrari JJ, Schwartz P. Prospective evaluation of feline sourced platelet-rich plasma using centrifuge-based systems. *Front Vet Sci.* (2020) 7:322. doi: 10.3389/fvets.2020.00322
22. Chun N, Canapp S, Carr BJ, Wong V, Curry J. Validation and characterization of platelet-rich plasma in the feline: a prospective analysis. *Front Vet Sci.* (2020) 7:512. doi: 10.3389/fvets.2020.00512
23. Dohan Ehrenfest DM, Rasmussen L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* (2009) 27:158–67. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009
24. Rossi LA, Murray IR, Chu CR, Muschler GE, Rodeo SA, Piuze NS. Classification systems for platelet-rich plasma. *Bone Joint J.* (2019) 101-B(8):891–6. doi: 10.1302/0301-620X.101B8.BJJ-2019-0037.R1
25. Mishra A, Woodall J, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med.* (2009) 28:113–25. doi: 10.1016/j.csm.2008.08.007
26. Lana JFSD, Purita J, Paulus C, Huber SC, Rodrigues BL, Rodrigues AA, et al. Contributions for classification of platelet rich plasma - proposal of a new classification: MARSPILL. *Regen Med.* (2017) 12:565–74. doi: 10.2217/rme-2017-0042
27. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* (2014) 4:3–9. doi: 10.32098/mltj.01.2014.02
28. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* (2006) 24:227–34. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.02.010
29. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* (2007) 28:4551–60. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.037
30. Clemmons RM, Bliss EL, Dorsey-Lee MR, Seachord CL, Meyers KM. Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals. *Thromb Haemost.* (1983) 50:838–43. doi: 10.1055/s-0038-1665324
31. Silva R, Rezende C, Paes-Leme F, Carmona J. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas felinas: estudio celular. *Arch Med Vet.* (2011) 43:187–90. doi: 10.4067/S0301-732X2011000200013
32. Oliver Ballester C, García De Carellán Mateo A, López Sepúlveda N, Soler I, Canet C, Serra Aguado CI. Estandarización de un protocolo de Plasma Rico en Plaquetas en la especie felina. In: *XI Southern European Veterinary Conference.* Barcelona (2017).
33. Damià Giménez E, Carrillo Poveda JM, Rubio Zaragoza M, Sopena Juncosa JJ. *Estudio experimental sobre la influencia del plasma rico en factores de crecimiento en la concentración seria del factor de crecimiento insulínico tipo I y la proteína C-reactiva en la especie canina.* Moncada: Universidad CEU Cardenal Herrera (2012).
34. Ikumi A, Hara Y, Yoshioka T, Kanamori A, Yamazaki M. Effect of local administration of platelet-rich plasma (PRP) on peripheral nerve regeneration: An experimental study in the rabbit model. *Microsurgery.* (2018) 38:300–9. doi: 10.1002/micr.30263
35. Gemignani F, Perazzi A, Iacopetti I. Use of canine sourced platelet-rich plasma in a feline contaminated cutaneous wound. *Can Vet J.* (2017) 58:141–4. Available online at: <https://doi.org/10.3390/vetsci8100213>
36. Soares CS, Barros LC, Saraiva V, Gomez-Florit M, Babo PS, Dias IR, et al. Bioengineered surgical repair of a chronic oronasal fistula in a cat using autologous platelet-rich fibrin and bone marrow with a tailored 3D printed implant. *J Feline Med Surg.* (2018) 20:835–43. doi: 10.1177/1098612X18789549
37. Aminkov K, Aminkov B, Zlateva-Panayotova N, Botev C. Application of platelet rich plasma (PRP) in treating of a complicated postoperative wound in a cat: a clinical case. *Tradit. Modern. Vet. Med.* 1:33–7. Available online at: <https://scij-tmvm.com/vol./vol.1/K.Aminkov%20et%20al.pdf>
38. Castilho MS, Rahal SC, Dias Neto RDN, Pereira AC, Francia CCDA, Mesquita LDR, et al. Preparation and characterization of leukocyte- and platelet-rich fibrin membrane derived from cats' blood. *Microsc Res Tech.* (2021) 84:1802–8. doi: 10.1002/jemt.23737
39. Silva RF, Carmona JU, Rezende CM. Ultrastructural characteristics of fibrin clots from canine and feline platelet concentrates activated with calcium gluconate or calcium gluconate plus batroxobin. *BMC Vet Res.* (2013) 9:77. doi: 10.1186/1746-6148-9-77
40. Soares CS, Babo PS, Faria S, Pires MA, Carvalho PP. Standardized Platelet-Rich Fibrin (PRF) from canine and feline origin: an analysis on its secretome pattern and architectural structure. *Cytokine.* (2021) 148:155695. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155695
41. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* (1999) 14:529–35.
42. Anitua E, Prado R, Orive G. Plasma rich in growth factors in dogs: two sides of the same coin. *Dent Res J (Isfahan).* (2017) 14:427–8. doi: 10.4103/1735-3327.218568
43. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* (2008) 29:37–41. doi: 10.1016/j.tips.2007.10.010
44. Arata S, Ohmi A, Mizukoshi F, Baba K, Ohno K, Setoguchi A, et al. Urinary transforming growth factor-beta1 in feline chronic renal failure. *J Vet Med Sci.* (2005) 67:1253–5. doi: 10.1292/jvms.67.1253
45. Van den Ouweland AM, Van Groningen JJ, Schalken JA, Van Neck HW, Bloemers HP, Van de Ven WJ. Genetic organization of the c-sis transcription unit. *Nucleic Acids Res.* (1987) 15:959–70. doi: 10.1093/nar/15.3.959
46. Mitander WM. *Evaluation of Platelet Parameters From Advia 2120 and Sysmex XT-2000iV in Samples From Dogs, Horses and Cats.* Uppsala: Uppsala University (2008).
47. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* (2004) 91:4–15. doi: 10.1160/TH03-07-0440

48. Anitua E, Sánchez M, Zaldueño MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif*. (2009) 42:162–70. doi: 10.1111/j.1365-2184.2009.00583.x
49. Anitua E, Zaldueño MM, Alkhraisat MH, Orive G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat*. (2013) 195:461–6. doi: 10.1016/j.aanat.2013.04.004
50. Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg*. (2014) 7:189–97. doi: 10.4103/0974-2077.150734
51. Carmona JU, López C, Sandoval JA. Review of the currently available system to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. *Rec Pat Regen Med*. (2012) 3:148–59. doi: 10.2174/2210296511303020005
52. Carr BJ, Canapp SO, Mason DR, Cox C, Hess T. Canine platelet-rich plasma systems: a prospective analysis. *Front Vet Sci*. (2015) 2:73. doi: 10.3389/fvets.2015.00073
53. Franklin SP, Garner BC, Cook JL. Characteristics of canine platelet-rich plasma prepared with five commercially available systems. *Am J Vet Res*. (2015) 76:822–7. doi: 10.2460/ajvr.76.9.822
54. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Drago J. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med*. (2011) 39:266–71. doi: 10.1177/0363546510387517
55. Stief M, Gottschalk J, Ionita JC, Einspanier A, Oechtering G, Böttcher P. Concentration of platelets and growth factors in canine autologous conditioned plasma. *Vet Comp Orthop Traumatol*. (2011) 24:122–5. doi: 10.3415/VCOT-10-04-0064
56. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*. (2012) 28:429–39. doi: 10.1016/j.arthro.2011.10.018
57. Zelmanovic D, Hetherington EJ. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Vet Clin Pathol*. (1998) 27:2–9. doi: 10.1111/j.1939-165X.1998.tb01071.x
58. Moritz A, Hoffmann C. [Platelet count in the cat]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. (1997) 25:695–700.
59. Norman EJ, Barron RC, Nash AS, Clappitt RB. Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell Counts. *Vet Clin Pathol*. (2001) 30:124–32. doi: 10.1111/j.1939-165X.2001.tb00420.x
60. Ellis J, Bell R, Barnes DC, Miller R. Prevalence and disease associations in feline thrombocytopenia: a retrospective study of 194 cases. *J Small Anim Pract*. (2018) 59:531–8. doi: 10.1111/jsap.12814
61. KE. R. *Platelet Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia*. Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edn. Ames, IA: Wiley-Blackwell (2010).
62. Riond B, Waßmuth AK, Hartnack S, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Study on the kinetics and influence of feline platelet aggregation and deaggregation. *BMC Vet Res*. (2015) 11:276. doi: 10.1186/s12917-015-0590-7
63. Brooks M, Catalfamo J. *Von Willebrand Disease*. Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edn. Ames, IA: Wiley-Blackwell (2010), p. 613.
64. Sousa SM, Sousa TM, Silva CF, Mendes CC. Pseudothrombocytopenia: a case of platelet satellitism and phagocytosis by neutrophils. *Platelets*. (2020) 31:541–3. doi: 10.1080/09537104.2019.1664733
65. Bhar VS, Singh R. Platelet satellitism: unusual cause of spurious thrombocytopenia. *J Hematopathol*. (2019) 12:171–2. doi: 10.1007/s12308-019-00365-9
66. Tvedten HW, Ljusner J, Lilliehöök IE. Enumeration of feline platelets in ethylenediamine tetra-acetic acid anticoagulated blood with the ADVIA 2120 system and two manual methods: leucoplate and Thrombo-TIC. *J Vet Diagn Invest*. (2013) 25:493–7. doi: 10.1177/1040638713493419
67. Jackson SR, Carter JM. Platelet volume: laboratory measurement and clinical application. *Blood Rev*. (1993) 7:104–13. doi: 10.1016/S0268-960X(05)80020-7
68. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost*. (2009) 102:248–57. doi: 10.1160/TH09-03-0192
69. Wasterline AS, Braun H, Dragoon JL. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper Tech Orthop*. (2012) 22:33–42. doi: 10.1053/j.oto.2011.11.001
70. Blood transfusions. BSAVA's Scientific Committee. British Small Animal Veterinary Association. *J Small Anim Pract*. (2000) 41:431–4. doi: 10.1111/j.1748-5827.2000.tb03241.x
71. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am*. (2012) 94:e143(1–8). doi: 10.2106/JBJS.L.00019
72. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. 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*. (2012) 13:1131–7. doi: 10.2174/138920112800624328
73. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di Martino A, et al. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. (2012) 20:2082–91. doi: 10.1007/s00167-011-1837-x
74. Torres-Torrillas M, Damiá E, Cerón JJ, Carrillo JM, Peláez P, Miguel L, et al. Treating full depth cartilage defects with intraosseous infiltration of plasma rich in growth factors: an experimental study in rabbits. *Cartilage*. (2021) 13(Suppl. 2):766S–73S. doi: 10.1177/19476035211057246
75. Geburek F, Gaus M, van Schie HT, Rohn K, Stadler PM. Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies - a randomized prospective controlled clinical trial. *BMC Vet Res*. (2016) 12:191. doi: 10.1186/s12917-016-0826-1
76. Torricelli P, Fini M, Filardo G, Tschon M, Pischetta M, Pacorini A, et al. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int Orthop*. (2011) 35:1569–76. doi: 10.1007/s00264-011-1237-3
77. Romero A, Barrachina L, Ranera B, Remacha AR, Moreno B, de Blas I, et al. Comparison of autologous bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells, and platelet rich plasma, for treating surgically induced lesions of the equine superficial digital flexor tendon. *Vet J*. (2017) 224:76–84. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.04.005
78. Fernández-Sarmiento JA, Domínguez JM, Granados MM, Morgaz J, Navarrete R, Carrillo JM, et al. Histological study of the influence of plasma rich in growth factors (PRGF) on the healing of divided Achilles tendons in sheep. *J Bone Joint Surg Am*. (2013) 95:246–55. doi: 10.2106/JBJS.K.01659
79. Chicharro-Alcántara D, Rubio-Zaragoza M, Damiá-Giménez E, Carrillo-Poveda JM, Cuervo-Serrato B, Peláez-Gorrea P, et al. Platelet rich plasma: new insights for cutaneous wound healing management. *J Funct Biomater*. (2018) 9:10. doi: 10.3390/jfb9010010
80. Rushton JO, Kammergruber E, Tichy A, Egerbacher M, Nell B, Gabner S. Effects of three blood derived products on equine corneal cells, an *in vitro* study. *Equine Vet J*. (2018) 50:356–62. doi: 10.1111/evj.12770
81. Farghali HA, AbdElKader NA, AbuBakr HO, Ramadan ES, Khattab MS, Salem NY, et al. Corneal ulcer in dogs and cats: novel clinical application of regenerative therapy using subconjunctival injection of autologous platelet-rich plasma. *Front Vet Sci*. (2021) 8:641265. doi: 10.3389/fvets.2021.641265
82. Chandler JC, Beale BS. Feline orthopedics. *Clin Tech Small Anim Pract*. (2002) 17:190–203. doi: 10.1053/svms.2002.36607

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Miguel-Pastor, Satué, Chicharro, Torres-Torrillas, del Romero, Peláez, Carrillo, Cuervo, Sopena, Cerón and Rubio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Anexo 2.



OPEN ACCESS

EDITED BY
 Laura Barrachina,
 University of Galway, Ireland

REVIEWED BY
 Jorge U. Carmona,
 University of Caldas, Colombia
 Stefano Grolli,
 University of Parma, Italy

*CORRESPONDENCE
 Joaquín J. Sopena
 ✉ j.sopena@uchceu.es

SPECIALTY SECTION
 This article was submitted to
 Veterinary Regenerative Medicine,
 a section of the journal
 Frontiers in Veterinary Science

RECEIVED 28 November 2022

ACCEPTED 09 January 2023

PUBLISHED 26 January 2023

CITATION

Miguel-Pastor L, Satué K, Chicharro D, Peláez P,
 Torres-Torrillas M, Carrillo JM, Cerón JJ,
 Sopena JJ and Rubio M (2023) Evaluation of
 Platelet-Rich Plasma by means of
 PRGF[®]-Endoret[®] protocol in leukemia cats:
 PDGF-BB and TGF-β1 valuation.
Front. Vet. Sci. 10:1110055.
 doi: 10.3389/fvets.2023.1110055

COPYRIGHT

© 2023 Miguel-Pastor, Satué, Chicharro,
 Peláez, Torres-Torrillas, Carrillo, Cerón, Sopena
 and Rubio. This is an open-access article
 distributed under the terms of the [Creative
 Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
 distribution or reproduction in other forums is
 permitted, provided the original author(s) and
 the copyright owner(s) are credited and that
 the original publication in this journal is cited, in
 accordance with accepted academic practice.
 No use, distribution or reproduction is
 permitted which does not comply with these
 terms.

Evaluation of Platelet-Rich Plasma by means of PRGF[®]-Endoret[®] protocol in leukemia cats: PDGF-BB and TGF-β1 valuation

Laura Miguel-Pastor¹, Katy Satué¹, Deborah Chicharro¹, Pau Peláez¹,
 Marta Torres-Torrillas¹, José M. Carrillo^{1,2}, José J. Cerón³,
 Joaquín J. Sopena^{1,2*} and Mónica Rubio^{1,2}

¹Bioregenerative Medicine and Applied Surgery Research Group, Department of Animal Medicine and Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain, ²García Cugat Foundation CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery, CEU Cardenal Herrera University, CEU Universities, Valencia, Spain, ³Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis, University of Murcia, Murcia, Spain

Introduction: Feline leukemia virus (FeLV) is a chronic disease that leads to the weakening of a cat's immune system. Platelet-rich plasma (PRP) offers therapeutic effects for multiple diseases, the use of PRP and growth factors (GFs) determination could be an alternative treatment to improve the quality of life in these patients. The objectives of this study were to determine and compare the concentration of platelets (PLTs), red blood cells (RBCs) and white blood cells (WBCs) between samples of whole blood (WB), PRP and platelet-poor plasma (PPP) fractions, and to evaluate the concentration of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor β1 (TGF-β1) in both fractions in FeLV cats using a PRGF[®]-Endoret[®] protocol previously standardized in this species.

Methods: WB was collected from 11 asymptomatic FeLV-positive cats. PRP and PPP was obtained following PRGF[®]-Endoret[®] technology according to centrifugation at 265 g for 10 min. Cellular components, RBCs, WBCs, PLTs, and the PDGF-BB and TGF-β1 concentrations in PRP and PPP fractions were determined.

Results: PLT in the PRP fraction was statistically higher than WB and PPP fraction, with no statistical differences between WB and PPP. PLT concentration increased 1.4 times in PRP fraction compared to WB. Mean platelet volume (MPV) did not differ significantly between the WB, PRP, and PPP fractions. Compared to WB, the absolute numbers of RBCs and WBCs were decreased by 99% and more than 95% in the PRP and PPP fractions, respectively. TGF-β1 concentrations increased in PRP vs. PPP, with no changes in PDGF-BB.

Discussion: Based on the degree of PLT enrichment and the absence of RBCs and WBCs, this blood product could be classified as a Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP). The presence of GFs in PRP and PPP samples suggests that the PRGF[®]-Endoret[®] methodology is suitable for obtaining PRP in FeLV cats, despite future studies are necessary to optimize the technique, standardize the results and assess clinical efficacy.

KEYWORDS

plasma rich in growth factors, PRGF[®]-Endoret[®], feline leukemia, FeLV, cat, PDGF-BB, TGF-β1, platelet

1. Introduction

Platelet-rich plasma (PRP) is an autologous blood product defined by a platelet (PLT) concentration higher than baseline. Inside, the PLTs have granules that, when activated, release growth factors (GFs), cytokines, and chemokines into the medium. Some of the most important GFs released by PLTs in PRP include platelet-derived growth factor (PDGF, A-B-C), transforming growth factor beta1 (TGF-β1), vascular endothelial growth factor (VEGF),

fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), connective tissue growth factor (CTGF), epidermal growth factor (EGF), and insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which are involved in tissue restoration and immunomodulation (1–4).

Taking into account the cellular content and the presence or absence of fibrin, four main groups of PRP products have been identified (5): Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP), Leukocyte and Platelet-Rich Plasma (LR-PRP), Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF), and Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF). P-PRP, as a PRGF[®]-Endoret[®] contains a moderate PLT concentration and no leukocytes (WBCs); LR-PRP includes a WBC fraction, but the fibrin matrix is sparse; P-PRF is a blood product with very low concentration of WBCs and is collected owing to the specific separator gel used in the method, PLT activation and fibrin polymerization are triggered using calcium chloride. L-PRF is considered as second-generation PLT concentrate because the natural concentrate is produced without any anticoagulants or gelifying agents, and after centrifugation the PRF clot forms a strong fibrin matrix in which most of the PLTs and WBCs from the harvested blood are concentrated. Continuous revisions of terminology and new classification criteria for PRP bioformulations in regenerative medicine (2) have made it possible to identify up to 15 types of PRP products with differences in formulation, biological properties and mechanisms of action, as well as different clinical indications and clinical results (6, 7). The topical use of PLT concentrates is recent, and its efficiency remains controversial. Several techniques for PLT concentrates are available, and their applications have been confusing because each method leads to a different product with a different biology and potential uses (8). Even though PRP has been widely used in veterinary medicine, no valid standardized classification methods for platelet-derived products have been currently published.

Plasma-Rich Growth Factors (PRGF) represents a novel technology that uses autologous proteins and GFs derived from PLTs as therapeutic formulations for regenerative purposes, cell repair and regeneration. PRGF[®]-Endoret[®] technology following a unique centrifugation protocol allows a PRP product to be obtained with moderate PLT enrichment and an extreme reduction of WBCs and RBCs, which decreases the proinflammatory activity of WBCs. The PRGF[®]-Endoret[®] protocol for obtaining GFs is widely documented in different species and has been successfully applied in different clinical areas (9–11), such as regenerative medicine for wound healing, ophthalmology, dentistry, osteoarthritis, tendinopathies, or aesthetic medicine in humans (12–19); traumatology and ophthalmology in dogs (20–22) and horses (23); and wound healing (24, 25) or the treatment of complete cartilage defects in rabbits (26). Although different protocols for obtaining PRP in cats have been described (27–32), the use of PRGF[®]-Endoret[®] technology in this species has only been reported in a previous study carried out by the same researchers. Due to the cellular characteristics of the autologous blood product obtained following centrifugation, it was classified as a P-PRP product (33). Despite this, there is no clinical evidence of its application, and therefore future research is needed in this field of feline internal medicine (28, 29, 33).

Feline viral leukemia is caused by feline leukemia virus (FeLV), one of the retroviruses with the greatest impact on feline health worldwide. The prevalence is highly variable depending on the geographic location and the animal population analyzed, varying between 3.0 and 28.4% in South America, 0.5 and

24.5% in Asia and Australia/New Zealand, 2.3 and 3.3% in the USA, and 0.7 and 15.6% in Europe, among others (34–40). In Spain, specifically, the reported prevalence of FeLV is 2.6% (41).

Following the course of the infection, four different forms of FeLV infection have been identified: abortive infection (“regressor cats”), regressive infection (“transient viremia” followed by “latent infection”), progressive infection (“persistent viremia”), and focal or atypical infection (42). Progressive infections are categorized by detectable antigenemia, FeLV RNA, and DNA provirus, since the virus persistently sheds into the circulation and tissues have low or no antibodies to FeLV (42). In 30–40% of cats with progressive infection, FeLV virus has tropism for the hematopoietic cells in the bone marrow (BM) associated with proliferative, degenerative, and oncogenic diseases in erythroid, myeloid, and lymphoid cell lineages (42). Both lymphoma (43) and myelodysplastic syndrome are relatively common abnormalities in FeLV-infected cats. Non-neoplastic diseases, such as regenerative anemia, immunosuppression, neutropenia, lymphopenia, and PLT abnormalities like thrombocytopenia or PLT function alterations, can occur in animals persistently infected with FeLV (35, 44–46). Moreover, ~80% of cats die before 4–5 years of life; prognosis for cats with progressive infections is variable depending upon current immune status, stress, or concurrent disease such that cats can remain without clinical signs for several years after the infection of the BM (47, 48).

Due to the fact that GFs promote wound healing or tissue regeneration in musculoskeletal injuries, such as osteoarthritis in dogs (20–22), horses (23), rabbits (26), and humans (49, 50), the authors considered that GFs could be an advantageous therapeutic option in cats with FeLV. For this reason, the objective of the study was to determine PLT concentrations and two specific types of GFs, such as Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) and Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), in both PPP and PRP fractions following the PRGF[®]-Endoret[®] protocol previously standardized for its application in cats by these same researchers (33). The authors hypothesize that a P-PRP can be obtained in FeLV cats following PRGF[®]-Endoret[®] methodology as in other species or in healthy cats.

2. Material and methods

2.1. Animals

The study protocol was approved by the Animal Welfare Ethics Committee (CEEAA) of the CEU Cardinal Herrera University in Valencia (Spain) in accordance with the Spanish Animal Protection Policy (RD53/2013), which complies with the European Union Directive European 2010/63/EU, with the following approval code: 2018/VSC/PEA/0196.

This prospective study included cats brought to CEU-Cardenal Herrera University Veterinary Clinical Hospital between October 2021 and July 2022 as part of a medical clinical study, during which cats were examined for retroviral infections. A total of fourteen non-pedigree FeLV-positive adult cats were included in the study. All animal owners agreed to participate in the study by signing a consent form.

Only animals clinically healthy and with two positive subsequent test results for FeLV by the commercially available combined enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for feline immunodeficiency virus (FIV) antibody and antigen FeLV p27 (IDEXX SNAP® Combo FeLV Ag/FIV Antibody Test) were included in the study. The first samples with positive results were subsequently tested again from 6 to 9 months after, following the same methodology, considering true positives or progressive infection by FeLV those that tested positive twice. Discordant test results were considered negative.

Animals receiving any treatment for the previous or current 6 months of the study and those that developed diseases or tested positive for both FIV and FeLV or only FIV were excluded from the study. Animals with hematological alterations consisting of anemia, leukopenia or true thrombocytopenia were also excluded. Each patient was monitored by a veterinarian throughout the entire procedure.

2.2. Sample processing

To reduce stress, cats were first intramuscularly (IM) sedated with a combination of butorphanol (0.3 mg/kg), dexmedetomidine (12 µg/kg), and alfaxalone (0.8 mg/kg). Following sedation, the cephalic vein was catheterized using a 22 G catheter to collect 0.5 ml of blood, which was immediately transferred to a 0.5 ml tube containing K3-EDTA (BD Vacutainer; Becton, Dickinson) for blood count or whole blood (WB) analysis. Thereafter, 9 ml of blood was collected in sterile conditions from the external jugular vein by means of a vacutainer sodium citrate 3.8% tube (Blood-Collecting Tubes®, BTI Biotechnology Institute, Alava, Spain) for PRGF®-Endoret® preparation. Subsequently, each cat received 9 ml of acetated Ringer's solution IV during the first 20 min to restore the vascular volume and to prevent hemodynamic complications.

2.3. PRGF®-Endoret® processing

Feline samples collected in sodium citrate tubes were immediately centrifuged at room temperature in a PRGF®-Endoret® System IV centrifuge (BTI Biotechnology Institute S.L.) under a single centrifugation protocol of 265 g for 10 min as described by Miguel-Pastor et al. (33).

Following the PRGF®-Endoret® methodology, two fractions were obtained after centrifugation: platelet-poor plasma (PPP) and PRP. Sixty percentage of the upper plasma was considered PPP, and the remaining 40% above the "buffy coat" was considered the PRP fraction. Both fractions were pipetted under maximum sterile conditions with a laminar flow hood and always by the same researcher. Subsequently, samples were transferred to individual fractionation tubes with no additives (PRGF® fractionation tubes, BTI, Institute of Biotechnology, Alava, Spain). In addition, the plasma fractions (PPP and PRP) were activated by adding 5% of the plasma volume of 10% calcium gluconate (activator PRGF®, Institute of Biotechnology, Alava, Spain) to achieve PLT degranulation and release of the GFs, obtaining PRGF. Plasma samples were then aliquoted into eppendorf tubes and immediately frozen at -80°C

following PLT activation for subsequent determination of TGF-β1 and PDGF-BB concentrations (Figure 1).

2.4. Hematological analysis

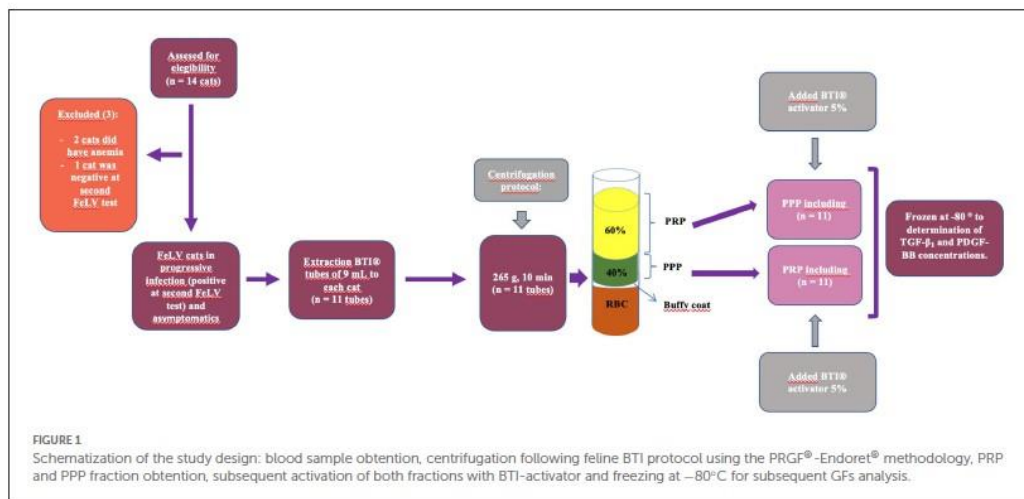
A complete automated blood count was performed for each feline specimen using the Advia® 2120i (Advia® 2120i Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), including red blood cell (RBC; $10^6/\mu\text{L}$), hemoglobin concentration (HB; g/dL), packed cell volume (PCV; %), mean corpuscular volume (MCV; fL), mean corpuscular hemoglobin (MCH; pg), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC; g/dL), mean hemoglobin content (CH; pg), hemoglobin concentration distribution width (HDW; d/dL), red blood cell distribution width (RDW; %), reticulocytes absolute count (RET; $10^9/\text{L}$), white blood cell (WBC; $10^3/\mu\text{L}$), neutrophils (NFS; $10^3/\mu\text{L}$), lymphocytes (LYMPH; $10^3/\mu\text{L}$), monocytes (MON; $10^3/\mu\text{L}$), eosinophils (EOS; $10^3/\mu\text{L}$), and basophils (BAS; $10^3/\mu\text{L}$). Platelet (PLT; $\text{K}/\mu\text{L}$) counts and mean platelet volume (MPV; fL) were also determined in WB samples. In the PRP and PPP fractions, RBC, PLT, WBC, LYMPH, NFS, and MON counts, as well as the MPV, were also determined. Verification of absolute PLT numbers, such as the presence of PLT aggregates and differential WBC counts obtained by ADVIA, was performed on Romanowsky-stained blood smears and always by the same pathologist.

2.5. Platelet-Derived Growth Factor-BB and Transforming Growth Factor-β1 quantification

The concentrations of both GFs in both plasma fractions (PPP and PRP) were determined using an ELISA kit of development with antibodies to human (Human TGF-beta1 DuoSet ELISA de R&D Systems DY240-05 and Human PDGF-BB DuoSet ELISA de R&D Systems DY220, respectively), following the methodology previously published by Miguel-Pastor et al. (33). To the knowledge of the authors, there are no commercial kits for GF determination in cats, so human kits were used for GFs determination as described by other researchers (27, 51).

2.6. Statistical methods

Data were analyzed using SPSS 20.0 for Windows (SPSS® Inc., Chicago, USA). A descriptive study of the mean, standard deviation and confidence intervals was performed for each variable. The normality of the data was verified in each variable with the Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of the variance was verified with the Levene test. The means of the variables were studied using a linear mixed model. These models included the treatment group as fixed effects and the cat as a random effect. If the interaction was found statistically significant, analyses using a one-way ANOVA and a Bonferroni test were used. Non-parametric Kruskal-Wallis tests were used to compare variables not adjusted to a normal distribution. $P < 0.05$ was considered significant.



3. Results

3.1. Animals and sample acquisition

Of the 14 cats initially included in the study, three of them were excluded: two presented moderate anemia and one tested negative on the second FeLV test. A total of 11 sterilized cats met the inclusion criteria, six males and five females, aged between 1.5 and 6.5 years (Mean: 4.4; SD: 1.6), and weighing between 3.7 and 5.8 kg (Mean: 4.7; SD: 0.7).

The collection and centrifugation of blood were performed with no interurrence in all cats. Following this procedure, the three fractions (erythrocyte, buffy coat area, and plasma fraction) were obtained.

Table 1 shows the mean values \pm SD or median and the 95% CI of all the hematological parameters considered in WB. Comparisons between RBC, PLT, WBC, LYMPH, NFS, and MON counts, as well as MPV between WB and PRP and PPP fractions, and comparisons between PDGF-BB and TGF- β 1 between PRP and PPP fractions are presented in Table 2. Table 3 shows individually the number of PLTs in WB, PRP, and PPP in relation to the volume of recovered plasma. Table 4 shows the recovered volume of PRP and PPP individually, considering the PCV in each animal.

3.2. Platelet concentration and mean platelet volume

The mean number of PLT was statistically higher in PRP (392.1 ± 130.7 PLTs) compared to PPP (260.8 ± 83.9 PLTs) fraction ($p = 0.024$) and WB (307.3 ± 106.2 PLTs) ($p = 0.043$) with no statistical differences between WB and PPP fraction (Tables 2, 3, Figure 2A). MPV did not differ significantly between the WB, PRP, and PPP fractions.

PLT aggregates were present in 4 (36%) WB samples, 2 (18%) PRP samples, and 2 (18%) PPP samples. According to the equivalence

between PLT aggregates by ADVIA 2120i and in smears (51), of the eight samples, seven presented 1–7 aggregates with more than 10 PLTs per field, and the remaining 1–3 aggregates with more than 50 PLTs per field.

3.3. RBC concentration

The number of RBCs was statistically higher in WB compared to the PRP and PPP fractions ($p < 0.01$), with no statistical differences between them. The PRGF®-Endoret protocol allowed reducing the number of RBCs by 99% in both PRP and PPP fractions (Figure 2B).

3.4. WBC concentration

The number of WBCs in WB was significantly higher compared to the PRP and PPP fractions ($p < 0.01$). The mean concentration of WBC was reduced by 95% in the PRP fraction and reduced by 97% in the PPP fraction (Figure 2C).

3.5. Lymphocyte concentration

The number of LYMPH was significantly higher in the WB fraction than in the PRP and PPP fractions. LYMPH concentration was significantly decreased by 80% ($p < 0.01$) and 88% in the PRP and PPP fractions ($p < 0.01$), respectively (Figure 2D). The mean number of LYMPH was significantly higher in the WB fraction compared to the PRP and PPP fractions.

3.6. Neutrophil concentration

The number of NFS was significantly higher in the WB fraction compared to the PRP and PPP fractions. The mean NFS

TABLE 1 Mean \pm SD of red blood cell (RBC) count, hemoglobin concentration (HB), packed cell volume (PCV), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean hemoglobin content (CH), hemoglobin concentration distribution width (HDW), red blood cell distribution width (RDW), reticulocytes absolute count (RET), white blood cell (WBC), neutrophil (NFS), lymphocyte (LYMPH), monocyte (MON), eosinophil (EOS), basophil (BAS) and platelet (PLT) counts, and mean platelet volume (MPV) in whole blood samples (WB) in 11 FeLV-positive cats ($n = 11$).

Parameter	N	Mean \pm SD	Minimum	Maximum	90% CI (lower reference limit)	90% CI (upper reference limit)	Reference range
Erythrogram							
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	11	7.4 \pm 1.1	5.9	9.9	6.7	8.1	5.0–10.0
HB (g/dl)	11	10.6 \pm 1.6	8.3	14.0	9.5	11.7	8.0–15.0
PCV (%)	11	30.9 \pm 4.6	23.0	40.5	27.9	34.1	24.0–45.0
MCV (fl)	11	41.9 \pm 3.8	32.2	46.7	39.4	44.4	39.0–55.0
MCH (pg)	11	14.3 \pm 1.5	11.2	16.4	13.3	15.3	12.5–17.5
MCHC (g/dl)	11	34.1 \pm 1.6	29.7	35.2	33.1	35.2	30.0–36.0
CH (pg)	11	14.8 \pm 1.2	11.8	16.1	13.9	15.6	12.0–16.0
HDW (g/dl)	11	2.4 \pm 0.2	2.12	2.88	2.2	2.5	1.6–2.9
RDW (%)	11	16.4 \pm 0.9	14.6	18.5	15.8	17.1	14.0–18.0
RET ($10^3/\mu\text{l}$)	11	54.3 \pm 40.6	13.8	134.9	27.1	81.6	15.0–81.0
Leukogram							
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	11	12.1 \pm 5.4	4.31	22.18	8.4	15.7	5.5–19.5
NFS ($10^3/\mu\text{l}$)	11	8.7 \pm 5.0	2.07	17.9	5.4	12.1	2.5–12.5
LYMPH ($10^3/\mu\text{l}$)	11	2.5 \pm 0.5	1.9	3.1	2.1	2.8	1.5–7.0
MON ($10^3/\mu\text{l}$)	11	0.32 \pm 0.19	0.1	0.7	0.2	0.4	0.0–0.9
EOS ($10^3/\mu\text{l}$)	11	0.9 \pm 1.7	0.0	6.1	0.0	2.0	0.0–0.8
BAS ($10^3/\mu\text{l}$)	11	0.3 \pm 0.9	0.0	3.0	0.0	0.9	0.0–0.2
Platelet parameters							
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	11	307.3 \pm 106.2	118.0	432.0	235.9	378.6	200–500
MPV (fl)	11	17.03 \pm 5.29	10.0	27.7	13.5	20.6	8.6–18.9

Reference values for the cat determined using ADVIA 2021i Laboratory of the Veterinary Clinical Hospital of the CEU-Cardenal Herrera University.

TABLE 2 Mean \pm SD of platelet (PLT) concentrations, mean platelet volume (MPV), erythrocytes (RBCs), leukocytes (WBC), lymphocytes (LYMPH), neutrophils (NFS), and monocytes (MON) concentrations in whole blood (WB) samples and in the PRP and PPP fractions; platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor B1 (TGF- β 1) concentrations in the PRP and PPP fractions in 11 FeLV cats ($n = 11$).

	WB	Centrifugation protocol (265 g \times 10 min)	
		PRP	PPP
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	307.3 \pm 106.2a	392.1 \pm 130.7b	260.8 \pm 83.9a
MPV (fl)	17.0 \pm 5.3a	14.1 \pm 3.6a	13.3 \pm 3.4a
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7.4 \pm 1.1a	0.1 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	12.1 \pm 5.4a	0.6 \pm 0.3b	0.3 \pm 0.2b
LYMPH ($10^3/\mu\text{L}$)	2.5 \pm 0.5a	0.5 \pm 0.3b	0.3 \pm 0.2b
NFS ($10^3/\mu\text{L}$)	8.7 \pm 4.9a	0.1 \pm 0.1b	0.0 \pm 0.0b
MON ($10^3/\mu\text{L}$)	0.3 \pm 0.2a	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b
PDGF-BB (pg/ml)		248.3 \pm 152.3a	198.5 \pm 143.2a
TGF- β 1 (pg/ml)		17,556.9 \pm 7,084.2a	11,487.3 \pm 3,427.7b

Different letters (a, b) indicate differences between groups. $P < 0.05$ is considered statistically significant.

TABLE 3 Number of platelets (PLT) in whole blood (WB) and platelet concentrations considering the total volumes of plasma in the PRP and PPP fractions.

Animal	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)			% concentration	
	WB	PRP	PPP	PRP	PPP
1	277	159	123	57.4	44.4
2	421	393	286	93.4	67.9
3	396	295	231	74.5	58.3
4	284	462	364	162.7	128.2
5	118	370	244	313.6	206.8
6	432	670	414	155.1	95.8
7	308	391	301	126.9	97.7
8	375	433	169	115.5	45.1
9	134	273	197	203.7	147.0
10	364	484	295	133.0	81.0
11	271	383	245	141.4	90.4
MEAN	307.3	392.1	260.8	143.4	96.6

TABLE 4 Individual packed cell volume (PCV; %) and recovered volumes of PRP (mL of plasma corresponding to the bottom 40% of the total plasma fraction) and PPP (mL of plasma corresponding to the top 60% of the plasma fraction) for each cat.

Animal	PCV (%) of WB	PRP volume (mL)	PPP volume (mL)
1	33.0	2.4	3.6
2	23.9	2.7	4.1
3	36.9	2.3	3.4
4	29.1	2.5	3.8
5	30.4	2.5	3.8
6	29.7	2.5	3.8
7	40.5	2.1	3.2
8	27.7	2.6	3.9
9	29.6	2.5	3.8
10	32.3	2.4	3.7
11	27.8	2.6	3.9

concentration was significantly decreased by 99% in both PRP and PPP fractions ($p < 0.01$; Figure 2E).

3.7. Monocyte concentration

The number of MON was significantly higher in the WB fraction compared to the PRP and PPP fractions. The mean MON concentration was significantly decreased by 97% in both PRP and PPP fractions ($p < 0.01$; Figure 2F).

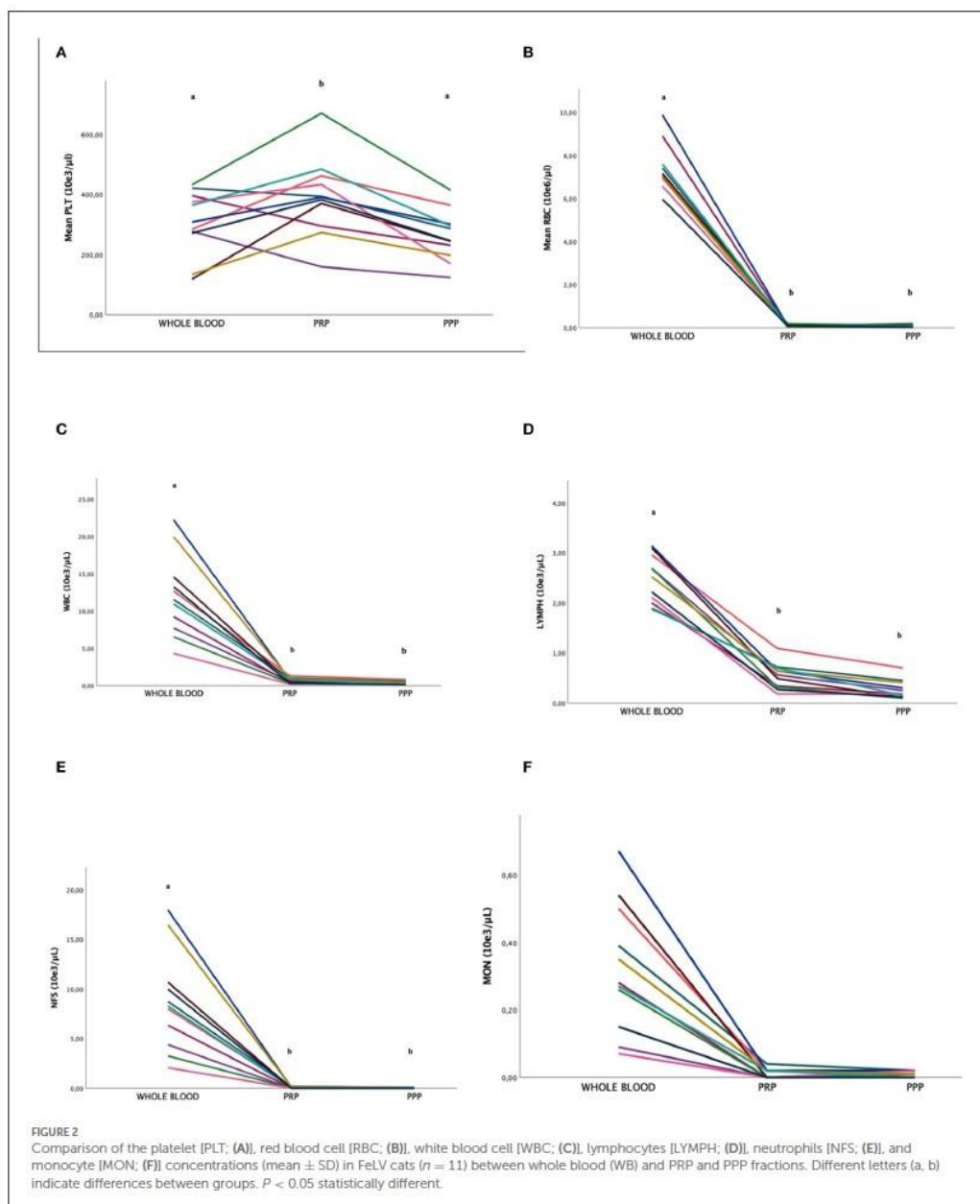
3.8. PDGF-BB and TGF- β 1 concentrations

No significant differences were found between the PRP and PPP fractions in PDGF-BB concentrations (Figure 3A), although in

samples with PLT aggregates, the values were higher ($p = 0.02$) than those without aggregates. The mean concentration of TGF- β 1 in the PRP fraction was statistically higher than the PPP fraction ($p = 0.02$) were not affected by the presence of aggregates (Figure 3B).

4. Discussion

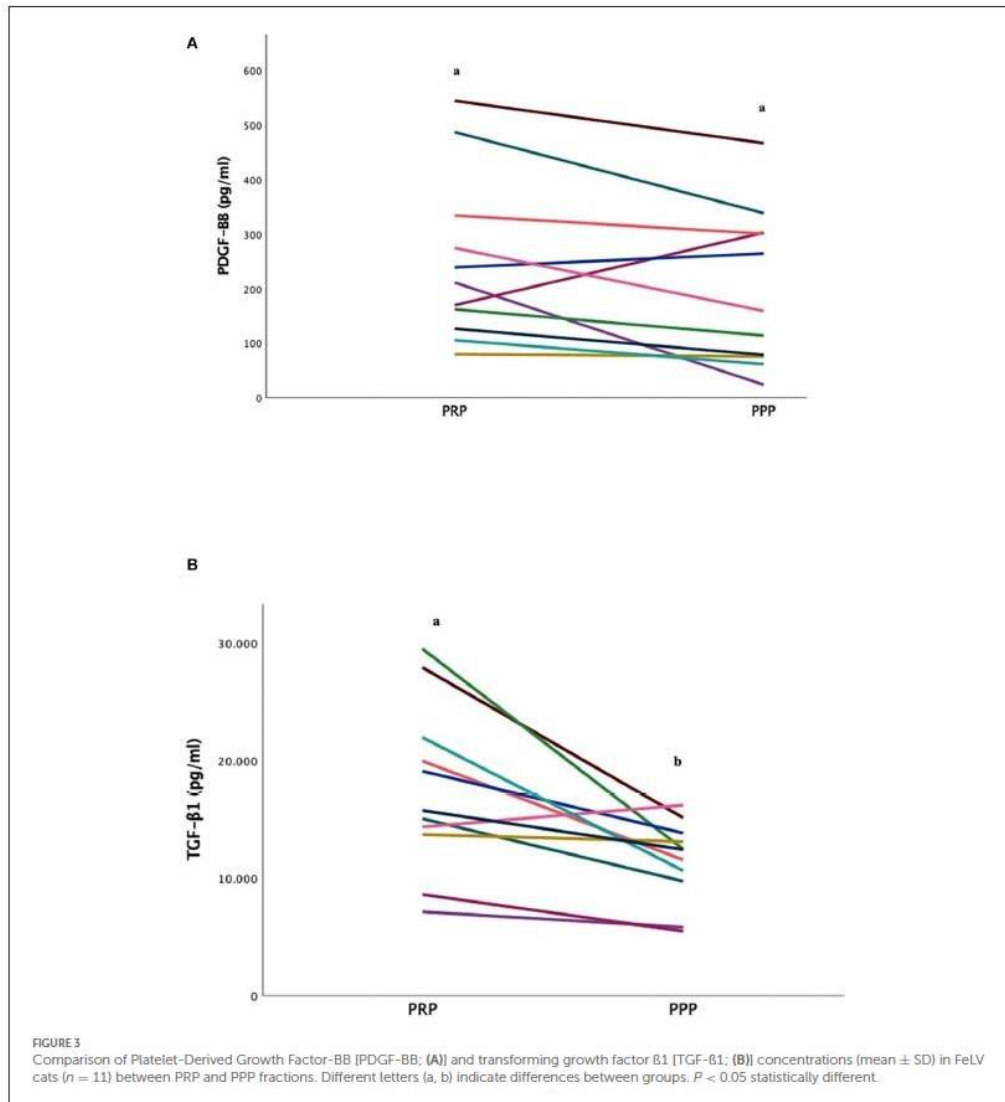
To the authors' knowledge, this is the first study to separate the PRP and PPP fractions in cats naturally infected with FeLV. The mean PLT enrichment was 1.4 (143%) times higher in the PRP fraction compared to the WB fraction. These results differ little from those observed in a previous study in healthy cats by the same authors in which PLT concentrate was 1.5 (147%) times higher in PRP fraction compared to the WB fraction using the same centrifugation protocol (33). Nevertheless, in other studies in which other types of protocols for obtaining PRP were used, increases in the concentration of PLTs in the PRP fraction were also detected compared to the WB fraction. Thus, Silva et al. showed 183% PLT enrichment in PRP vs. WB using 85 g gravitational force for 6 min in 8.5 mL tubes containing 1.5 mL ACD-A solution (trisodium citrate, citric acid, and dextrose) (27). More recently, Chun et al. reported a 151% PLT enrichment in a 12.5 mL volume of WB in a 30 mL syringe with 2.5 mL citrate and dextrose anticoagulant by double centrifugation at 3,600 rpm for 1 min and then 3,800 rpm for 5 min (29). Likewise, Ferrari and Schwartz (28) evaluated the PLT concentration of PRP within two commercial centrifugation systems. With system 1, 13.5 mL of WB was included in a syringe with 1.5 mL of ACDA and centrifuged at 1,300 rpm for 5 min. Using system 2, 12.5 mL of WB were taken in a syringe with 2.5 mL of ACDA following two consecutive centrifugations at 3,600 rpm for 1 min and at 3,800 rpm for 5 min. While System 1 reduced PLT concentrations by 3%, System 2 increased PLT concentrations by 187% (28). To evaluate the effect of local autologous PRP on healing by secondary intention of skin disorders in cats, a recent study by Angelou et al. (32) included 11 mL of WB in a vacuum tube containing separating gel and anticoagulant (MACD7) and centrifuged at 1,500 rpm for



10 min. PLT counts in the obtained PRP product increased from 2 to 8.2 times compared to WB in this latter study (32). Even though we cannot specify the exact origin of these differences, factors such as WB volume samples, gravitational force, and centrifugation times in the different protocols used to obtain PRP, should be

taken into account since the basal PLT number in the WB fraction were similar.

The mean number of PLTs in the PRP fraction in this study was 392.1 ± 130.7 PLTs, not obtaining homogeneous results in all samples, as can be seen in the standard deviation (145.8 PLTs). This



was probably the reason why there were no differences found between WB and PPP. In addition, PLT concentrations in PRP of FeLV cats was lower than that obtained previously in healthy animals (481.4 ± 275.0 PLTs) by these same authors (33). A similar trend of PLTs in PPP (260.8 ± 83.9 PLTs) vs. healthy cats (293.3 ± 161.4 PLT) was observed. This fact is probably related to individual variability since in both cases the PRP fraction was obtained using the same sample volume, relative centrifugal force, temperature, and time of centrifugation. The results of this study show that the PPP fraction

contains a considerable proportion PLTs that should have been concentrated in the PRP, as a result optimization of the technique is crucial to obtain a more PLT-concentrated PRP. Following the BTI-Endoret[®] methodology, the PRP fraction was obtained in this study using a single centrifugation protocol. The authors highlight the need of optimizing the protocol with future studies on blood sample centrifugation protocols by varying the gravitational force or the centrifugation time to obtain PRP with a higher concentration of PLTs following PRGF[®]-Endoret[®] characteristics; or even taking into

consideration the need of a second centrifugation to recover more PLTs in the PRP and decrease them in the PPP fractions.

The moderate enrichment in PLT and the absolute reduction in the number of RBCs and WBCs, including LYMPH, NFS, and MON, in both the PRP and PPP fractions enabling a P-PRP in FeLV cats similar to those established in healthy cats by these same researchers (33). However, there was a minimum requirement that a PRP of at least 1.5 should compare to WB according to the PRGF[®]-Endoret[®] methodology (9) as previously described in healthy cats (33), dogs (20), and rabbits (52). A larger population of sick cats may elucidate the origin of these differences, since none of the animals included in the study presented thrombocytopenia.

Pseudothrombocytopenia in feline blood samples is a common finding on blood smears in both FeLV positive and healthy animals (53). In fact, from the 11 WB samples analyzed, four presented aggregates, or 36%, as previously reported in these same species (33). Other studies have reported higher rates of pseudothrombocytopenia: 40% (28), 57% (54), 62% (53), and 71% (55, 56). The large size of PLTs, the secretion of granules when exposed to high concentrations of serotonin, and irreversible aggregation in response to adenosine diphosphate (ADP) reduction are factors involved in the formation of PLT clumps in these species (57). However, the sampling quality is the main cause of PLT aggregation in feline WB samples (58, 59). The presence of PLT aggregates in the samples of this study could be related to the collection method, since the WB samples were obtained directly by catheterization of the cephalic vein using a 22 G catheter. It is well-known that the lesion of vascular endothelium produced by venipuncture causes PLT adherence to von Willebrand factor bound to subendothelial collagen with PLT GPIIb/IIIa receptors, which induces additional PLT recruitment (60, 61). PLT counts by ADVIA were falsely decreased in samples with EDTA-induced pseudothrombocytopenia and was confirmed in the corresponding blood smears. Since pseudothrombocytopenia is a common occurrence in cats, the results of the samples with and without aggregates were included in the same statistical study, which could have induced the variations in PLT numbers in WB.

In this study, the MPV did not vary between the different analyzed samples (WB, PRP, and PPP). The results in relation to this parameter seemed controversial between studies. Indeed, compared to PLT concentrate, MPV increased in WB samples (33) although higher values in PLT concentrates compared to WB have been reported (27). MPV represents the average size of PLTs, increasing during PLT activation (62) and dependent on factors, such as anticoagulant, temperature and storage time of the blood sample (63–65). Although ADVIA is one of the best methods for PLT analysis (53), feline blood can contain PLTs larger than 60 fL (66) and may not be detected by the analyzer. This failure to detect large PLTs may be the reason why the number is falsely lower in some of the samples tested. Also, a low number of large PLT may not sufficiently increase MPV above the upper limit of the reference range.

Studies in cats with naturally occurring FeLV infections are valuable in providing practical clinical guidance and outcome expectations. The diagnosis carried out on these animals consisted of a rapid test (ELISA), detecting the presence of the virus (antigen) in blood, which does not always indicate the presence of the disease. Since these cats lived in an endemic area, the probability of false positives in the test could be excluded. As

the test was repeated between 180 and 270 days after the first diagnosis of FeLV, these animals were considered to have the progressive form of the disease. Positive results could not be due to vaccination or maternal transfer of the virus, since the animals were adults and did not receive a vaccination regimen. The normal erythrogram and leukogram in the present study reinforce the hypothesis of the absence of BM involvement, since anemic, leukopenic, or thrombocytopenic animals were excluded. It is common that in persistently infected cats with the progressive form of infection hematopoietic cells invade the bone marrow (42), causing neoplastic hematopoietic pathologies, such as lymphoma (43), myelodysplastic syndrome (48), or non-neoplastic, including non-regenerative or regenerative anemia, immunosuppression, lymphopenia, neutropenia, and thrombocytopenia (35, 44–47). A leukogram characterized by leukocytosis with right shift neutrophilia and lymphopenia in response to stress was identified in two cats. Asymptomatic FeLV-positive animals are known to be less likely to have reduced blood counts than symptomatic ones (47). However, the type of viral strain, its pathogenicity and the type of study with experimentally vs. naturally infected animals may explain these discordant findings (67, 68), though future studies are needed to elucidate it.

Although there is no previous evidence on the effect of viral infections on the quality of PLT concentrate in cats, PDGF-BB and TGF- β 1 concentrations were determined in FeLV-positive animals according to the PRGF[®]-Endoret[®] protocol previously described (33). In contrast to Silva's et al. (27) study, lower values of PDGF-BB were obtained in FeLV cats but similar or higher values of TGF- β 1 compared to healthy cats. In addition, in FeLV positive cats, lower values of PDGF-BB but similar values of TGF- β 1 than in healthy cats (33) have been obtained. Several reports in humans have documented elevated TGF- β 1 in blood, lymphoid tissues and cerebrospinal fluid in people infected with human immunodeficiency virus (HIV) (69). This elevation of cytokines was associated with defective T-cell recall, as well as B-lymphocyte proliferative responses and immunoglobulin production related to proapoptotic mechanisms (69). The marked increase in TGF- β 1 with advancing HIV-1 infection suggests an important immunosuppressive role of TGF- β 1 in the pathogenesis of this infection (70, 71). On the other hand, PDGF-BB were associated with severe disease in humans with COVID-19. This pro-inflammatory mediator indicates that innate immune cell responses and anti-viral T-cell responses are responsible for SARS-CoV-2 pathogenesis in COVID-19 patients (72).

The goal of this study was to characterize PRP and to determine GFs in both PRP and PPP fractions in FeLV positive cats. One of the most important limitations of this study was the small sample size in which only positive asymptomatic animals were considered, therefore, it cannot be considered representative of the entire FeLV positive feline population. The lack of a control group or the use of plasma from negative animals, same as the use of samples from positive animals in which the virus was purified by extraction with triton x 100 compared to the immunoassay for the detection of the FeLV p27 antigen used in our study has not allowed us to obtain comparative results.

On the other hand, since the GFs in PLT concentrates are modified by the type of PLT activator and other factors such as time and temperature, it would have been interesting to assess to what extent the time and temperature before proceeding to the

freezing of the samples could have modified the concentrations of TGF- β 1 and PDGF-BB in this study. Taking these limitations into account, further research with regards to GFs obtained by PRGF[®]-Endoret[®] methodology is needed. Since PRP obtained in our study showed similar characteristics to PRP products following PRGF[®]-Endoret[®] system, asymptomatic animals could benefit from the use of GFs in cutaneous wounds, osteoarthritis, or bone fractures to improve their quality of life. since there is no cure for FeLV. However, further studies are needed to evaluate and define the potential clinical applications of PRP in FeLV-positive cats.

5. Conclusions

Using PRGF[®]-Endoret[®] technology, it was possible to obtain and differentiate the PRP and PPP fractions in FeLV positive cats. The moderate PLT enrichment and the absolute reduction of RBCs and WBCs in the samples obtained have allowed the product to be classified as a P-PRP, although the minimum required for the PLT concentrate was not reached. The optimization and standardization of the protocol for the use of PRGF could represent an alternative to alleviate the side effects induced by the virus in feline patients.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Animal Welfare Ethics Committee (CEEA) of the CEU Cardenal Herrera University in Valencia (Spain). Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

References

- Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. 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.* (2012) 13:1131–7. doi: 10.2174/138920112800624328
- Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *Int J Mol Sci.* (2020) 21:7794. doi: 10.3390/ijms21207794
- Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost.* (2015) 13:2141–51. doi: 10.1111/jth.13147
- Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* (2009) 23:177–89. doi: 10.1016/j.blre.2009.04.001
- Kon E, Di Matteo B, Delgado D, Cole BJ, Dorotei A, Dragoo JL, et al. Platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis: an expert opinion and proposal for a novel classification and coding system. *Expert Opin Biol Ther.* (2020) 20:1447–60. doi: 10.1080/14712598.2020.1798925

Author contributions

LM-P performed the experiment. LM-P and KS analyzed data and wrote the manuscript and developed the first draft of the manuscript. DC, MT-T, and PP participated in performing the experiment. JMC, MR, and JS designed the study, supervised all procedures, and coordinated the research. MR and KS performed statistical analysis. JJC analyzed blood samples. JS proofread the manuscript and gave final approval of the version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This study was funded by the García Cugat Foundation CEU-UCH Chair of Medicine and Regenerative Surgery and the project INDI21/54 CEU-UCH and INDI22/53 CEU-UCH.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Cátedra García Cugat for their technical support, veterinarians, collaborators at the Veterinary Hospital of CEU Cardenal Herrera University, patients, and owners.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- Everts PA, van Erp A, DeSimone A, Cohen DS, Gardner RD. Platelet rich plasma in orthopedic surgical medicine. *Platelets.* (2021) 32:163–74. doi: 10.1080/09537104.2020.1869717
- Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, Louis ML, Silvestre A, Giraudo L, et al. DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport Exerc Med.* (2016) 2:e000060. doi: 10.1136/bmjsem-2015-000060
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* (2009) 27:158–67. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009
- Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* (2007) 28:4551–60. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.037
- Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* (2006) 24:227–34. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.02.010

11. Solakoglu Ö, Heydecke G, Amiri N, Anitua E. The use of plasma rich in growth factors (PRGF) in guided tissue regeneration and guided bone regeneration. A review of histological, immunohistochemical, histomorphometrical, radiological and clinical results in humans. *Ann Anat.* (2020) 231:151528. doi: 10.1016/j.aanat.2020.151528
12. Soares RM, Prazeres Lopes S. Plasma rich in growth factors (PRGF-ENDORET®) to rescue necrotized orbital dermis-fat grafts. *Orbit.* (2021) 41:558–62. doi: 10.1080/01676830.2021.1966811
13. Rahhal-Ortuño M, Fernández-Santodomingo AS, Martínez-Rubio C, Barranco-González H, Almor-Palacios I, Rodrigo-Hernández A. Use of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret®) fibrin membrane to cover corneal dellen. *Rom J Ophthalmol.* (2021) 65:293–5. doi: 10.22336/rjo.2021.60
14. Navarro R, Pino A, Martínez-Andrés A, Garrigós E, Sánchez MI, Gallego E, et al. Combined therapy with endoret-gel and plasma rich in growth factors vs endoret-gel alone in the management of facial rejuvenation: a comparative study. *J Cosmet Dermatol.* (2020) 19:2616–26. doi: 10.1111/jocd.13661
15. Anitua E, Sanchez M, De la Fuente M, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* (2012) 20:1657–65. doi: 10.1007/s00167-011-1697-4
16. Anitua E, Muruzábal F, Riestra A, De la Fuente M, Merayo-Llaves J. Galenic validation of plasma rich in growth factors eye drops. *Farm Hosp.* (2019) 43:45–9. doi: 10.3999/fh.11106
17. Vaquerizo V, Padilla S, Aguirre JJ, Begoña L, Orive G, Anitua E. Two cycles of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) intra-articular injections improve stiffness and activities of daily living but not pain compared to one cycle on patients with symptomatic knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* (2018) 26:2615–21. doi: 10.1007/s00167-017-4565-z
18. Giacomello M, Giacomello A, Mortellaro C, Gallesio G, Mozzati M. Temporomandibular joint disorders treated with articular injection: the effectiveness of plasma rich in growth factors-Endoret. *J Craniofac Surg.* (2015) 26:709–13. doi: 10.1097/SCS.0000000000001534
19. Giacomello MS, Mortellaro C, Giacomello A, Scali JJ, Greco Lucchina A. Management of large perforations of the sinus mucosa with PRGF-Endoret® platelet concentrate. *J Biol Regul Homeost Agents.* (2021) 35 (2 Suppl. 1):9–19. doi: 10.23812/21-2suppl-2
20. Damiá Giménez E, Carrillo Poveda JM, Rubio Zaragoza M, Sopena Juncosa JJ. *Estudio Experimental Sobre la Influencia Del Plasma Rico En Factores De Crecimiento En La Concentración Serica Del Factor De Crecimiento Insulinico Tipo I y La Proteína C-Reactiva En La Especie Canina.* Moccada: Universidad CEU Cardenal Herrera (2012).
21. Vilar JM, Morales M, Santana A, Spinella G, Rubio M, Cuervo B, et al. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Vet Res.* (2013) 9:131. doi: 10.1186/1746-6148-9-131
22. Cuervo B, Rubio M, Sopena J, Domínguez JM, Vilar J, Morales M, et al. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci.* (2014) 15:13437–60. doi: 10.3390/ijms150813437
23. Rushton JO, Kammergruber E, Tichy A, Egerbacher M, Nell B, Gabner S. Effects of three blood derived products on equine corneal cells, an *in vitro* study. *Equine Vet J.* (2018) 50:356–62. doi: 10.1111/evj.12770
24. Chicharro D, Carrillo JM, Rubio M, Cugat R, Cuervo B, Guil S, et al. Combined plasma rich in growth factors and adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the cutaneous wound healing in rabbits. *BMC Vet Res.* (2018) 14:288. doi: 10.1186/s12917-018-1577-y
25. Chicharro-Alcántara D, Rubio-Zaragoza M, Damiá-Giménez E, Carrillo-Poveda JM, Cuervo-Serrato B, Peláez-Gorrea P, et al. Platelet rich plasma: new insights for cutaneous wound healing management. *J Funct Biomater.* (2018) 9:10. doi: 10.3390/fjb9010010
26. Torres-Torrillas M, Damiá E, Cerón JJ, Carrillo JM, Peláez P, Miguel L, et al. Treating full depth cartilage defects with intraosseous infiltration of plasma rich in growth factors: an experimental study in rabbits. *Cartilage.* (2021) 13:766S–73S. doi: 10.1177/19476035211057246
27. Silva RF, Alvarez ME, Ríos DL, López C, Carmona JU, Rezende CM. Evaluation of the effect of calcium gluconate and bovine thrombin on the temporal release of transforming growth factor beta 1 and platelet-derived growth factor isoform BB from feline platelet concentrates. *BMC Vet Res.* (2012) 8:212. doi: 10.1186/1746-6148-8-212
28. Ferrari JT, Schwartz P. Prospective evaluation of feline sourced platelet-rich plasma using centrifuge-based systems. *Front Vet Sci.* (2020) 7:322. doi: 10.3389/fvets.2020.00322
29. Chun N, Canapp S, Carr BJ, Wong V, Curry J. Validation and characterization of platelet-rich plasma in the feline: a prospective analysis. *Front Vet Sci.* (2020) 7:512. doi: 10.3389/fvets.2020.00512
30. Oliver Ballester C, García De Carellán Mateo A, López Sepúlveda N, Soler I Canet C, Serra Aguado CI. Estandarización de un protocolo de plasma rico en plaquetas en la especie felina. In: *XI Southern European Veterinary Conference*. Barcelona (2017).
31. Silva R, Rezende C, Paes-Leme F, Carmona J. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas felinas: estudio celular. *Arch Med Vet.* (2011) 43:187–90. doi: 10.4067/S0301-732X2011000200013
32. Angelou V, Psalla D, Dovas CI, Kazakos GM, Marouda C, Chatzimisos K, et al. Locally injected autologous platelet-rich plasma improves cutaneous wound healing in cats. *Animals.* (2022) 12:1993. doi: 10.3390/ani12151993
33. Miguel-Pastor L, Sateu K, Chicharro D, Torres-Torrillas M, Del Romero A, Peláez P, et al. Evaluation of a standardized protocol for plasma rich in growth factors obtention in cats: a prospective study. *Front Vet Sci.* (2022) 9:866547. doi: 10.3389/fvets.2022.954516
34. Little S, Sears W, Lachtera J, Bienzle D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. *Can Vet J.* (2009) 50:644–8.
35. Gleich S, Hartmann K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J Vet Intern Med.* (2009) 23:552–8. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0303.x
36. Hellard E, Fouchet D, Santin-Janin H, Tarin B, Badol V, Coupier C, et al. When cats' ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris* cats). *Prev Vet Med.* (2011) 101:250–64. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.020
37. Englert T, Lutz H, Sauter-Louis C, Hartmann K. Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany. *J Feline Med Surg.* (2012) 14:392–8. doi: 10.1177/1098612X12440531
38. Spada E, Proverbio D, della Pepa A, Perego R, Baggiani L, DeGiorgi GB, et al. Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and toxoplasma gondii in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data. *J Feline Med Surg.* (2012) 14:369–77. doi: 10.1177/1098612X12437352
39. Westman M, Norris J, Malik R, Hofmann-Lehmann R, Harvey A, McLuckie A, et al. The diagnosis of feline leukaemia virus (FeLV) infection in owned and group-housed rescue cats in Australia. *Viruses.* (2019) 11:503. doi: 10.3390/v11060503
40. Hofmann-Lehmann R, Gönczi E, Riond B, Meli M, Willi B, Howard J, et al. [Feline leukemia virus infection: importance and current situation in Switzerland]. *Schweiz Arch Tierheilkd.* (2018) 160:95–105. doi: 10.17236/sat00146
41. Studer N, Lutz H, Saegerman C, Gönczi E, Meli ML, Boo G, et al. Pan-European study on the prevalence of the feline leukaemia virus infection - reported by the European advisory board on cat diseases (ABCDC Europe). *Viruses.* (2019) 11:993. doi: 10.3390/v11110993
42. Little S, Levy J, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Hosie M, Olah G, et al. 2020 AAEP feline retrovirus testing and management guidelines. *J Feline Med Surg.* (2020) 22:5–30. doi: 10.1177/1098612X19895940
43. Louwerens M, London CA, Pedersen NC, Lyons LA. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med.* (2005) 19:329–35. doi: 10.1111/j.1939-1676.2005.tb02703.x
44. Hartmann K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* (2011) 143:190–201. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.06.003
45. Meichner K, Kruse DB, Hirschberger J, Hartmann K. Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. *Vet Rec.* (2012) 171:348. doi: 10.1136/vr.100813
46. Pare A, Ellis A, Juette T. Clinicopathological findings of FeLV- positive cats at a secondary referral center in Florida, USA (2008-2019). *PLoS ONE.* (2022) 17:e0266621. doi: 10.1371/journal.pone.0266621
47. Hartmann K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses.* (2012) 4:2684–710. doi: 10.3390/v4112684
48. Hofmann-Lehmann R, Hartmann K. Feline leukaemia virus infection: a practical approach to diagnosis. *J Feline Med Surg.* (2020) 22:831–46. doi: 10.1177/1098612X20941785
49. Zhang W, Guo Y, Kuss M, Shi W, Aldrich AL, Untrauer J, et al. Platelet-Rich plasma for the treatment of tissue infection: preparation and clinical evaluation. *Tissue Eng Part B Rev.* (2019) 25:225–36. doi: 10.1089/ten.teb.2018.0309
50. Li H, Hamza T, Tidwell JE, Clovis N, Li B. Unique antimicrobial effects of platelet-rich plasma and its efficacy as a prophylaxis to prevent implant-associated spinal infection. *Adv Healthc Mater.* (2013) 2:1277–84. doi: 10.1002/adhm.201200465
51. Mitander WM. *Evaluation of Platelet Parameters From Advia 2120 and Sysmex XT-2000iV in Samples From Dogs, Horses and Cats.* Uppsala: Uppsala University (2008).
52. Ikumi A, Hara Y, Yoshioka T, Kanamori A, Yamazaki M. Effect of local administration of platelet-rich plasma (PRP) on peripheral nerve regeneration: an experimental study in the rabbit model. *Microsurgery.* (2018) 38:300–9. doi: 10.1002/micr.30263
53. Zelmanovic D, Hetherington EJ. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Vet Clin Pathol.* (1998) 27:2–9. doi: 10.1111/j.1939-165X.1998.tb01071.x
54. Riond B, Waßmuth AK, Hartnack S, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Study on the kinetics and influence of feline platelet aggregation and deaggregation. *BMC Vet Res.* (2015) 11:276. doi: 10.1186/s12917-015-0590-7
55. Norman EJ, Barron RC, Nash AS, Clappitt RB. Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell counts. *Vet Clin Pathol.* (2001) 30:124–32. doi: 10.1111/j.1939-165X.2001.tb00420.x

56. Norman EJ, Barron RC, Nash AS, Clappitt RB. Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Vet Clin Pathol.* (2001) 30:137–40. doi: 10.1111/j.1939-165X.2001.tb00422.x
57. Russel KE. Platelets Kinetics Laboratory Evaluation Of Thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. Ames, IA: Wiley-Blackwell (2010). p. 576–85.
58. Moritz A, Hoffmann C. [Platelet count in the cat]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* (1997) 25:695–700.
59. Weiser MG, Kociba GJ. Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. *Am J Vet Res.* (1984) 45:518–22.
60. Grindem CB, Breitschwerdt EB, Corbett WT, Jans HE. Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases. *Vet Clin Pathol.* (1991) 20:38–43. doi: 10.1111/j.1939-165X.1991.tb00566.x
61. Koplitz SL, Scott MA, Cohn LA. Effects of platelet clumping on platelet concentrations measured by use of impedance or buffy coat analysis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* (2001) 219:1552–6. doi: 10.2460/javma.2001.219.1552
62. Vagdatli E, Gounari E, Lazaridou E, Katsibourlia E, Tsikopoulou F, Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia.* (2010) 14:28–32.
63. Jackson SR, Carter JM. Platelet volume: laboratory measurement and clinical application. *Blood Rev.* (1993) 7:104–13. doi: 10.1016/S0268-960X(05)80020-7
64. Handagama P, Feldman B, Kono C, Farver T. Mean platelet volume artifacts: the effect of anticoagulants and temperature on canine platelets. *Vet Clin Pathol.* (1986) 15:13–7. doi: 10.1111/j.1939-165X.1986.tb00651.x
65. Mylonakis ME, Leontides L, Farmaki R, Kostoulas P, Koutinas AF, Christopher M. Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. *J Vet Diagn Invest.* (2008) 20:774–9. doi: 10.1177/10406387080200609
66. Tvedten HW, Ljusner J, Lilliehöök IE. Enumeration of feline platelets in ethylenediamine tetra-acetic acid anticoagulated blood with the ADVIA 2120 system and two manual methods: leucoplate and thrombo-TIC. *J Vet Diagn Invest.* (2013) 25:493–7. doi: 10.1177/1040638713493419
67. Hofmann-Lehmann R, Holznagel E, Ossent P, Lutz H. Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. *Clin Diagn Lab Immunol.* (1997) 4:33–42. doi: 10.1128/cdli.4.1.33-42.1997
68. Carvalho Lacerda L, Nascimento da Silva A, Dáley Santos Cruz R, de Souza Freitas J, About Said R, Dias Munhoz A. Hematological and biochemical aspects of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and feline leukemia. *Braz J Vet Med.* (2021) 42:e110020. doi: 10.29374/2527-2179.bjvm110020
69. Theron AJ, Anderson R, Rossouw TM, Steel HC. The role of transforming growth factor beta-1 in the progression of HIV/AIDS and development of non-AIDS-defining fibrotic disorders. *Front Immunol.* (2017) 8:1461. doi: 10.3389/fimmu.2017.01461
70. Wiercińska-Drapalo A, Flisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D. Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. *Viral Immunol.* (2004) 17:109–13. doi: 10.1089/088282404322875502
71. Young BE, Ong SWX, Ng LFP, Anderson DE, Chia WN, Chia PY, et al. Viral dynamics and immune correlates of coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity. *Clin Infect Dis.* (2021) 73:e2932–42. doi: 10.1093/cid/ciaa1280
72. Gupta A, Jayakumar MN, Saleh MA, Kannan M, Halwani R, Qaisar R, et al. SARS-CoV-2 infection- induced growth factors play differential roles in COVID-19 pathogenesis. *Life Sci.* (2022) 304:120703. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120703