

***EL ETAMSILATO COMO FÁRMACO  
HEMOSTÁTICO EN LA CLÍNICA DEL  
BOVINO***

***Farmacocinética, tolerancia y eficacia en la reducción  
del sangrado de heridas en la especie bovina***

***Josep M. Homedes Beguer***

*Memoria presentada para optar  
al grado de Doctor en Veterinaria*

*Barcelona, Febrero de 2002*



**Lluís Monreal Bosch**, Professor Titular del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que la tesi doctoral que té per títol: *EL ETAMSILATO COMO FÁRMACO HEMOSTÁTICO EN LA CLÍNICA DEL BOVINO*, de la que n'és autor el llicenciat en Veterinària **Josep M. Homedes Beguer**, s'ha realitzat en els Laboratoris Dr. Esteve S.A. sota la meva direcció.

I perquè així consti, a efectes de ser presentada com a treball de Tesi per a optar al grau de Doctor en Veterinària, firma el present certificat a Bellaterra, el 22 de Febrer de 2002.

Lluís Monreal Bosch



*a M<sup>a</sup> Elena*



*Este trabajo no hubiera podido realizarse sin la participación de diversas personas, algunas implicadas muy directamente durante la preparación, experimentación o redacción de la tesis y otras, quizás sin saberlo, influyendo de forma determinante en las motivaciones e inquietudes que han guiado todo el largo proceso que, por fin, toma forma en este texto. Sabiendo de antemano que no es posible ponderar en su justa medida cada una de estas contribuciones, quisiera, al menos, agradecer muy sinceramente la ayuda que, profesores, compañeros, amigos y familiares me han prestado durante todos estos años.*

*A mi director de Tesis, Lluís Monreal, por su dirección técnica, su ánimo incansable para hacer progresar la redacción de este trabajo así como por su comprensión ante las dificultades surgidas. Sin su entusiasmo nada de esto hubiera tenido lugar.*

*A mis compañeros Irene Mayós, David Sabaté y Rosa Calonge por su imprescindible participación en la realización de los estudios aquí descritos y por las enriquecedoras discusiones sobre las incógnitas surgidas. Su inestimable colaboración ha sido esencial en todo momento.*

*A Emili Gil por el continuado apoyo y confianza que ha depositado en mí y que ha permitido la realización de este y muchos otros trabajos y, por*

*extensión, a los Laboratorios Dr. ESTEVE S.A. en la confianza de que su esfuerzo en investigación en el campo veterinario persista, fructifique y se consolide.*

*A mi hermana Núria y mis profesores Dan Brown y Kirk Klasing, por haberme mostrado en su día la perseverancia, la humildad, el espíritu crítico y la mentalidad abierta del genuino espíritu investigador, y a mis amigos y compañeros Eugeni y David por servirme de constante estímulo y ejemplo a seguir. Sin sus respectivas influencias, mi vida hubiera seguido un curso diferente.*

*A mis compañeros de Veterinaria Esteve a lo largo de los años, por su constante ayuda e interés por el desarrollo de este trabajo.*

*A mis amigos y familiares, y especialmente a mi mujer, M<sup>a</sup> Elena, por las muchas mañanas, tardes, noches y fiestas de guardar en que han tenido que divertirse solos para que pudiera progresar otro capítulo del presente trabajo. Gracias por vuestra comprensión y por seguir a mi lado apoyándome hasta el final.*



## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>V</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 PLANTEAMIENTO.....</b>	<b>3</b>
<b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
2.1 MECANISMOS DE COAGULACIÓN. EL SISTEMA HEMOSTÁTICO.....	9
2.1.1 Componentes fundamentales.....	10
2.1.1.1 Los vasos sanguíneos.....	10
2.1.1.2 Las plaquetas.....	13
2.1.2 La hemostasia primaria.....	18
2.1.2.1 Activación de las plaquetas.....	22
2.1.2.2 El tapón hemostático primario.....	30
2.1.2.3 Particularidades de la plaqueta bovina.....	34
2.1.3 El tapón hemostático secundario.....	37
2.1.4 La Fibrinólisis.....	46
2.2 MÉTODOS DE VALORACIÓN DE LA HEMOSTASIA.....	48
2.2.1 Parámetros de valoración de la hemostasia primaria.....	49
2.2.1.1 Recuento de Plaquetas.....	50
2.2.1.2 Tiempo de Sangría.....	52
2.2.1.3 Otros tests de la hemostasia primaria.....	61
2.2.2 Parámetros de valoración de la hemostasia secundaria y la fibrinólisis.....	63
2.2.2.1 Tiempo de Protrombina.....	64
2.2.2.2 Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada.....	65
2.2.2.3 El Tiempo de Trombina.....	66
2.2.2.4 Determinación del Fibrinógeno.....	67
2.2.2.5 Productos de Degradación de la Fibrina.....	68
2.2.3 Determinación de factores específicos.....	69
2.2.4 Pruebas de uso experimental.....	70

2.3	USO DE HEMOSTÁTICOS EN TERAPÉUTICA VETERINARIA.....	72
2.3.1	<i>Situaciones clínicas</i> .....	72
2.3.2	<i>Agentes utilizados en la terapia hemostática</i> .....	77
2.3.2.1	Tratamientos hemostáticos tópicos.....	78
2.3.2.2	Tratamientos hemostáticos sistémicos.....	80
2.4	ETAMSILATO.....	85
2.4.1	<i>Introducción</i> .....	85
2.4.2	<i>Descripción y caracterización</i> .....	86
2.4.3	<i>Mecanismo de acción</i> .....	87
2.4.3.1	Acción hemostática del etamsilato.....	87
2.4.3.2	Aumento de la resistencia capilar o acción angioprotectora y disminución de la permeabilidad capilar.....	92
2.4.3.3	Actividad antiinflamatoria de etamsilato.....	93
2.4.4	<i>Metabolismo, estudios de farmacocinética</i> .....	94
2.4.4.1	Distribución del etamsilato en el ratón.....	94
2.4.4.2	Farmacocinética del etamsilato en rata.....	95
2.4.4.3	Farmacocinética del etamsilato en conejo.....	96
2.4.4.4	Farmacocinética del etamsilato en hombre.....	97
2.4.5	<i>Toxicidad y tolerancia</i> .....	100
2.4.6	<i>Eficacia clínica</i> .....	103
2.4.6.1	Conejo.....	104
2.4.6.2	Cerdo.....	106
2.4.6.3	Perro.....	107
2.4.6.4	Hombre.....	108
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>119</b>

<b>4 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>123</b>
4.1 FARMACOCINÉTICA.....	128
4.1.1 <i>Animales</i> .....	129
4.1.2 <i>Producto</i> .....	129
4.1.3 <i>Protocolo del estudio</i> .....	130
4.1.3.1 Administración del producto.....	130
4.1.3.2 Toma de muestras.....	131
4.1.3.3 Procesamiento de las muestras.....	132
4.1.3.4 Análisis de las muestras.....	132
4.1.4 <i>Tratamiento de los datos</i> .....	133
4.1.4.1 Parámetros.....	133
4.1.4.2 Estadística.....	136
4.2 TOLERANCIA.....	137
4.2.1 <i>Animales</i> .....	138
4.2.2 <i>Tratamiento</i> .....	139
4.2.3 <i>Protocolo del estudio</i> .....	140
4.2.3.1 Fase de aclimatación.....	140
4.2.3.2 Fase experimental.....	141
4.2.3.2.1 Examen clínico.....	141
4.2.3.2.2 Toma de muestras.....	142
4.2.4 <i>Tratamiento de los datos</i> .....	146
4.2.4.1 Estadística.....	146
4.3 EFICACIA.....	148
4.3.1 <i>Animales</i> .....	149
4.3.2 <i>Tratamientos</i> .....	149
4.3.3 <i>Protocolo del estudio</i> .....	150
4.3.3.1 Preparación de los animales.....	151
4.3.3.2 Tiempos de sangría.....	152
4.3.3.3 Muestras de sangre.....	153
4.3.4 <i>Tratamiento de los datos</i> .....	155
4.3.4.1 Estadística.....	155

<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>158</b>
5.1 FARMACOCINÉTICA.....	158
5.1.1 Estado de los animales.....	158
5.1.2 Niveles plasmáticos de etamsilato.....	159
5.1.2.1 Tras la administración intravenosa.....	159
5.1.2.2 Tras la administración intramuscular.....	163
5.1.3 Parámetros farmacocinéticos.....	165
5.2 TOLERANCIA.....	168
5.2.1 Tolerancia sistémica.....	168
5.2.1.1 Estado de los animales.....	168
5.2.1.2 Evolución clínica de los animales.....	169
5.2.1.2.1 Parámetros clínicos.....	169
5.2.1.2.2 Parámetros sanguíneos.....	169
5.2.1.3 Evolución del peso de los animales.....	177
5.2.2 Tolerancia local.....	178
5.2.2.1 Estado de los animales. Inspecciones clínicas.....	178
5.2.2.2 Niveles de CK.....	178
5.3 EFICACIA.....	181
5.3.1 Estado general de los animales.....	181
5.3.2 Parámetros hemostáticos.....	181
5.3.3 Tiempos de sangría.....	183
5.3.3.1 Grupo Etamsilato.....	183
5.3.3.2 Grupo Placebo.....	184
5.3.3.3 Diferencias entre tratamientos.....	186
<b>6 DISCUSIÓN.....</b>	<b>190</b>
6.1 FARMACOCINÉTICA.....	190
6.1.1 Administración intravenosa.....	191
6.1.2 Administración intramuscular.....	194
6.2 TOLERANCIA.....	199
6.2.1 Tolerancia local.....	199
6.2.2 Tolerancia sistémica.....	200
6.3 EFICACIA.....	203
6.4 PROPUESTAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES.....	212
<b>7 CONCLUSIONES.....</b>	<b>218</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>222</b>

## **RESUMEN**

El etamsilato es un fármaco ampliamente utilizado en medicina veterinaria y humana para el control de la hemostasia en diversos procesos patológicos, intervenciones quirúrgicas y manipulaciones obstétricas. Se ha descrito que su mecanismo de acción se basa en la interacción endotelio-plaquetas a nivel de la hemostasia primaria y presumiblemente mediado por la prostaciclina. Sin embargo, a pesar de su amplio uso en bóvidos, no existen trabajos científicos publicados que avalen su seguridad y eficacia en esta especie.

Al objeto de sentar unas bases experimentales que avalaran su utilización en la clínica del vacuno se han llevado a cabo tres estudios, cuyos resultados analizados conjuntamente deberían permitir el uso del etamsilato sobre la base de criterios científicos.

En primer lugar, para conocer la evolución de las concentraciones plasmáticas de etamsilato a lo largo del tiempo, se realizó un estudio farmacocinético a dosis única tras su administración intravenosa (IV) e intramuscular (IM) en terneros. Para ello se escogió una dosis de 7,5 mg/kg por ser la más representativa del rango de dosis utilizadas habitualmente en clínica.

En segundo lugar, a fin de describir un margen de seguridad mínimo, se realizó un estudio de tolerancia local, tras la administración de 7,5 mg/kg por vía IM y otro de tolerancia general, tras la administración IV de dosis reiteradas. Para el estudio de la tolerancia general se escogió como referencia la dosis máxima de las utilizadas en la práctica habitual (12,5 mg/kg) y se duplicó para forzar la aparición de cualquier signo de intolerancia a nivel clínico, hemostático, hematológico o bioquímico. Asimismo, y con el mismo objetivo, se administró el producto durante 10 días consecutivos, por ser el doble de la máxima pauta recomendada.

Finalmente, para avalar la eficacia del etamsilato en el control de la hemostasia se realizó un estudio en el que se midieron los efectos de una dosis única de etamsilato sobre el tiempo de sangría (TS). Se escogió el TS por ser un test estandarizado y que ya se había

utilizado con éxito para la demostración de la eficacia del etamsilato en diversas especies. Se utilizó la dosis más alta de las recomendadas (12,5 mg/kg) para facilitar la detección de los efectos del producto, en una única administración. El estudio se realizó siguiendo un modelo cruzado de modo que cada animal actuó como su propio control tomando como referencia tanto su nivel basal como los efectos de la administración de un placebo.

Las concentraciones plasmáticas del etamsilato tras su administración IV mostraron una distribución limitada, evidenciada por un Volumen de Distribución (Vd) de  $0,44 \pm 0,10$  L/kg, una eliminación rápida, con un aclaramiento (Cl) de  $0,21 \pm 0,04$  L/h.kg y una Semivida de eliminación ( $T_{1/2}$ ) de  $1,49 \pm 0,16$  h. Tras su administración IM se observó una Biodisponibilidad (F) muy elevada y superior al 98%. Las concentraciones plasmáticas alcanzadas por ambas vías fueron substancialmente menores que las descritas en el hombre tras la administración de dosis equivalentes, a pesar de tener una  $T_{1/2}$  similar.

El estudio de tolerancia reveló una ausencia de efectos tanto a nivel local, medida por las variaciones en la enzima creatinfosfokinasa (CK), como general, valorada por la sintomatología clínica y diversos parámetros sanguíneos (hematológicos, bioquímicos y hemostáticos).

El estudio de eficacia mostró un descenso significativo del TS del 16% respecto a sus valores basales dos horas después de la administración IV de etamsilato. El porcentaje de disminución del TS fue mayor en aquellos animales que tenían el TS basal más largo, mostrando una correlación estadísticamente significativa. Sin embargo, el porcentaje medio de reducción fue sensiblemente menor a los descritos para otras especies animales o para el hombre y no alcanzó diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.

Se concluye que el etamsilato es un fármaco útil para su uso como antihemorrágico en la práctica de la clínica de vacuno, siendo muy seguro para esta especie, tanto tras su administración IV como IM, sin producir ningún tipo de efectos adversos y mostrando una eficacia moderada a la dosis recomendada. Su administración IM permite mantener unos niveles plasmáticos más persistentes con una elevada biodisponibilidad y buena tolerancia local. Sin embargo, es necesario realizar ulteriores investigaciones para confirmar su eficacia en bóvidos a dosis y tiempos de determinación previamente validados.

## **SUMMARY**

Ethamsylate is a widely used drug in veterinary and human medicine for the control of hemostasis in several pathologic processes, surgical procedures and obstetric manoeuvres. It has been described that its mechanism of action is based on the interaction endothelium-platelet at the primary hemostasis level and, presumably mediated by prostacyclin. However, despite its widespread use in bovine, there are no published scientific reports supporting its safety and efficacy in this species.

In order to obtain some experimental basis for its use in bovine practice three studies have been carried out, the results of which, analysed as a whole, should allow the use of ethamsylate upon scientific criteria.

Firstly, in order to know the evolution of the plasmatic concentrations of ethamsylate versus time, a single dose pharmacokinetic study after its intravenous (IV) and intramuscular (IM) administration to calves was performed. For this purpose a dose of 7,5 mg/kg was chosen as the most representative of the dose range normally used in practice.

Secondly, in order to describe a minimum safety margin, a local tolerance study after its administration of 7,5 mg/kg IM and another of general tolerance, after the IV repeated dosing, were performed. For the general tolerance study the maximum dose normally used in practice (12,5 mg/kg) was chosen as a reference and was duplicated in order to force the appearance of any sign of intolerance in the clinical examination or in the haemostatic, haematological or biochemical parameters studied. Also, and with the same objective, the product was administered during 10 consecutive days, since this is twice the maximum recommended treatment duration.

Finally, in order to endorse the efficacy of ethamsylate in the control of hemostasis, a study measuring the effects of a single ethamsylate dose on bleeding time (BT), was carried out. BT was chosen since it is a standardised test and it had previously been

successfully used for the demonstration of the efficacy of ethamsylate in several species. The maximum recommended dose (12,5 mg/kg) was selected in order to facilitate the detection of the effects of the product after a single administration. The study was performed following a cross-over design so each animal acted as its own control taking as references its basal level as well as the effects of the administration of a placebo.

The plasmatic concentrations of ethamsylate after its IV administration showed a limited distribution, substantiated by a Volume of Distribution (Vd) of  $0,44 \pm 0,10$  L/kg, a rapid elimination, with a Clearance (Cl) of  $0,21 \pm 0,04$  L/h.kg and an elimination Half Life ( $T_{1/2}$ ) of  $1,49 \pm 0,16$  h. After its IM administration, a very high Bioavailability (F), over 98%, was observed. The plasmatic concentrations reached by both routes were substantially lower than those described in man after the administration of equivalent doses, despite having a similar  $T_{1/2}$ .

The tolerance study revealed an absence of effects both at local level, measured by the variations of the enzyme Creatinphosphokinase (CK), and at general level, assessed by the clinical symptomatology and several blood parameters (haematological, biochemical and hemostatic).

The efficacy study showed a significant shortening of the BT of 16% respective to its basal values two hours after the IV administration of ethamsylate. The percentage of reduction of the BT was higher in those animals having the longest basal BT, showing a statistically significant correlation. However, the average percentage of reduction was sensitively lower than those described for other animal species or for humans and it did not reach statistically significant differences with respect to the control group.

It is concluded that ethamsylate is a useful drug for its use as antihemorrhagic in bovine clinical practice, being very safe for this species after its IV or IM administration, without inducing any kind of adverse effects and having a moderate efficacy at the recommended dose. Its IM administration maintains more persistent plasmatic levels, with a high bioavailability and good local tolerance. However, it is necessary to carry out further research in order to confirm its efficacy in bovine at previously validated doses and timings.



# Capítulo 1

## PLANTEAMIENTO



## **1 PLANTEAMIENTO**

En la clínica cotidiana de vacuno, el veterinario se enfrenta a numerosas situaciones en que existe un riesgo, más o menos controlado, de hemorragia. Ello puede deberse a diferentes procesos, algunos congénitos y de presentación esporádica o, con mucha mayor frecuencia, a intoxicaciones o procesos infecciosos, víricos, bacterianos o parasitarios, en los que la hemorragia es un signo más de la enfermedad y raramente considerada como determinante en la evolución del proceso. Paradójicamente, la casuística más frecuente de hemorragias en vacuno viene determinada por la propia intervención del veterinario a través de intervenciones quirúrgicas o manipulaciones obstétricas.

En efecto, aún contando con un perfecto conocimiento de la vascularización de la zona a intervenir y con la excelencia práctica del clínico, durante una intervención quirúrgica pueden producirse diferentes tipos de hemorragias. La sección accidental de grandes vasos sólo puede paliarse mediante su pinzamiento o sutura, y depende enteramente de la pericia del cirujano. Sin embargo en toda intervención se produce la rotura de pequeños vasos y capilares que producen hemorragias en sábana. Este tipo de hemorragia enmascara el campo quirúrgico y requiere la constante utilización de gasas o

material absorbente para permitir la correcta visualización. En la clínica de pequeños animales o en el hombre, la gravedad de estas hemorragias puede determinar una mayor o menor necesidad de transfusiones sanguíneas tras la intervención.

En las condiciones habituales en las que se ejerce la clínica de vacuno, incluyendo las intervenciones quirúrgicas, no suele contarse con las condiciones y material técnico ni humano comparable a las del quirófano más precario. En circunstancias en que la intervención se produce en el campo o en una cuadra, frecuentemente con la única colaboración de personal no especialmente cualificado para estas tareas, el veterinario se enfrenta a situaciones que representan un riesgo mucho mayor que en las condiciones ideales de un hospital. En estas condiciones es imperativo evitar, no sólo las grandes hemorragias por sección de medianos o grandes vasos, sino también las pequeñas hemorragias en sábana que dificultan y, en ocasiones, pueden ser causantes del fracaso de la intervención o incluso del postoperatorio.

La prevención de problemas hemorrágicos durante las intervenciones debe realizarse a varios niveles. En primer lugar debe realizarse una exploración completa del paciente durante el pre-operatorio que necesariamente debe incluir una valoración de unos parámetros hemostáticos mínimos para descartar posibles defectos de coagulación. Las particularidades de la clínica de vacuno hacen que esta práctica, habitual en cirugía humana y cada vez más frecuente en la clínica de animales de compañía, no se realice en las circunstancias normales de campo, de modo que el cirujano veterinario de vacuno suele intervenir sin que pueda prever la respuesta hemostática del paciente. En segundo lugar, el cirujano debe conocer con la mayor exactitud la anatomía de los principales vasos sanguíneos de la zona, así como de la vía de acceso al punto a intervenir. El resto queda generalmente en manos de la habilidad del cirujano para evitar dañar vasos importantes, cortando rápidamente cualquier hemorragia durante la intervención y suturando o cauterizando heridas y vasos para evitar problemas en el post-operatorio.

Sin embargo, existen recursos terapéuticos para favorecer los mecanismos hemostáticos y prevenir posibles problemas durante, o posteriormente a la intervención quirúrgica, así como en el caso de otros procesos, de diversa etiología, que puedan cursar con hemorragias o alteraciones de la coagulación. Estos fármacos, favorecedores de la coagulación, actúan a diferentes niveles de la hemostasia y han sido desarrollados generalmente para su uso en humanos, si bien suelen aplicarse también en la clínica veterinaria en general y en la de vacuno en particular. El hecho de que su experimentación en animales, y concretamente en la especie bovina sea muy limitada o nula, hace que se apliquen de forma más o menos empírica en la clínica de vacuno bien para prevenir problemas hemorrágicos en las intervenciones quirúrgicas u obstétricas o para paliar cuadros hemorrágicos ya evidenciados durante otros procesos patológicos.

Del arsenal terapéutico existente, tan sólo el etamsilato ha tenido algún grado de desarrollo aplicado a veterinaria, siendo utilizado y comercializado en diversos países para su uso en la clínica de vacuno. A pesar de su amplia utilización, este fármaco no ha sido hasta ahora estudiado específicamente en su aplicación como hemostático en la clínica del ganado bovino.

El presente trabajo se plantea como una aproximación al uso del etamsilato en vacuno, con el ánimo de caracterizar la cinética plasmática del fármaco, valorar el margen de seguridad de su aplicación y demostrar su eficacia como favorecedor de la coagulación en la especie bovina. Esta información debe servir al veterinario especialista en vacuno para emplear este fármaco en condiciones demostradas de seguridad y eficacia, como una valiosa ayuda en la práctica clínica. Para ello se revisa la información bibliográfica existente sobre este fármaco y los mecanismos hemostáticos de la especie bovina y se describen una serie de tres experimentos (farmacocinética, tolerancia y eficacia), diseñados y llevados a cabo teniendo en cuenta las condiciones habituales de uso del etamsilato en vacuno.



## Capítulo 2

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA





## **2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Mecanismos de coagulación. El sistema hemostático**

La función principal del sistema hemostático es el mantenimiento de la fluidez de la sangre, evitando tanto la coagulación intravascular como que la sangre escape de los vasos sanguíneos (Couto 1999). Cuando un pequeño vaso sanguíneo es seccionado o dañado se inician una serie de fenómenos que tienden a prevenir o detener la pérdida de sangre (hemorragia) ocasionada por dicha lesión. Este fenómeno recibe el nombre de hemostasia (Guyton 1983, Green 1997).

La hemostasia es un proceso fisiológico regulado que lleva a cabo acciones complejas destinadas a dar una respuesta rápida a cualquier daño del sistema vascular y cuyo resultado final es la formación de un trombo ó coágulo de fibrina-plaquetas. Este tapón es el que realiza la función de sellado del vaso lesionado, evitando de este modo la pérdida de sangre mientras tiene lugar la reparación de la lesión. Este proceso comprende interacciones fisiológicas y bioquímicas que implican a la dinámica del flujo sanguíneo, componentes del endotelio vascular, factores de coagulación de la sangre, plaquetas y al sistema fibrinolítico. Todos estos factores se interrelacionan para minimizar la pérdida extravascular de sangre y

promover la curación subsiguiente del daño tisular, manteniendo en todo momento la continuidad del flujo sanguíneo y la perfusión tisular. Como veremos, los componentes fundamentales de este sistema son los **vasos sanguíneos**, las **plaquetas** y los **factores plasmáticos** pudiéndose distinguir tres fases bien diferenciadas aunque muy relacionadas entre ellas, a veces incluso simultáneas, y que se suelen denominar **Hemostasia primaria**, **Hemostasia secundaria o Coagulación de la sangre**, y **Fibrinólisis** (Troy 1988).

### ***2.1.1 Componentes fundamentales***

#### ***2.1.1.1 Los vasos sanguíneos***

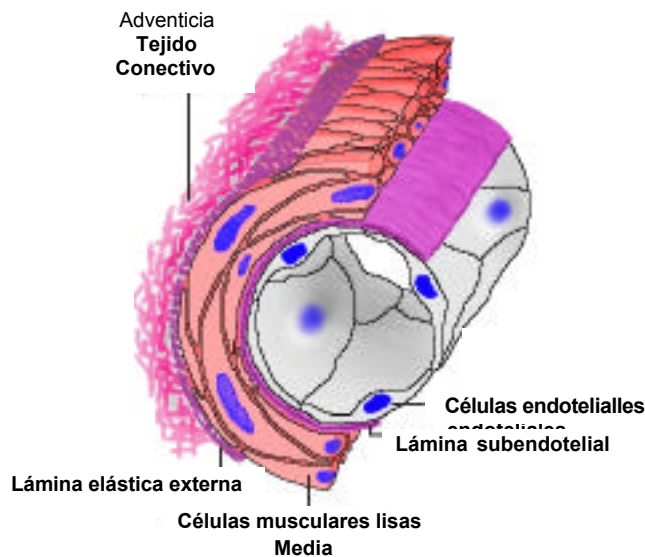
Los vasos sanguíneos constituyen un sistema cerrado, sin fugas, que mantiene la sangre en un estado fluido. La constitución de los vasos sanguíneos varía según el tipo de vaso (arteria, vena o capilar) así como de su calibre. Sin embargo, podemos generalizar diciendo que los vasos sanguíneos están constituidos por células endoteliales rodeadas por una membrana basal subendotelial (íntima), que a su vez están rodeadas de células musculares lisas y su matriz extracelular (media), rodeada a su vez por fibroblastos y su matriz extracelular (adventicia). En el caso de las venas, las capas musculares lisas son más delgadas, estando del todo ausentes en los capilares (Elias 1961, Hathaway y Goodnight 1993a).

**La media y la adventicia** son las partes más externas y proveen fuerza mecánica al vaso. Están compuestas de células musculares lisas y circulares entremezcladas con fibras elásticas. La contracción o relajación de estas fibras produce la contracción o dilatación de los vasos. En caso de grandes vasos, las capas más externas albergan la propia vascularización del vaso o *vasa vasorum*.

**La íntima**, o **membrana subendotelial** es una capa elástica que contiene diversas proteínas adhesivas, sintetizadas por las células endoteliales, que proveen de lugares de unión para las plaquetas y leucocitos (ej. Colágeno, laminina, microfibrillas,

trombospondina, fibronectina, elastina, vitronectina y Factor de von Willebrand (FvW)). Como se verá más adelante, esta capa tiene una importancia vital para iniciar el proceso de adhesión plaquetar durante la formación del tapón hemostático primario. Así, el colágeno es un potente activador plaquetar y promueve su adherencia a los componentes subendoteliales; la fibronectina promueve la adhesión, agregación y aglutinación plaquetar, lo que ayuda a localizar la reacción hemostática y el FvW es esencial para la adecuada adhesión plaquetar (Troy 1988, Hathaway y Goodnight 1993a).

**Figura 1. Estructura general de un vaso sanguíneo**



**Las células endoteliales** son el elemento fundamental de los capilares. Son células planas, aunque muestran un cierto abultamiento alrededor del núcleo, irregulares y de forma hexagonal. Su eje longitudinal es paralelo a la dirección del vaso y se disponen en forma curvada, ajustándose entre ellas sin interrupción, formando así el tubo de la pared capilar o del endotelio. El **endotelio** es extraordinariamente delgado, permitiendo el paso de electrolitos y de pequeñas moléculas a través del citoplasma de las células endoteliales (Elias 1961). A pesar de su simple estructura existen algunas diferencias entre las

células endoteliales de arterias, venas y capilares y sus características en diferentes localizaciones del cuerpo (Troy 1988).

Hasta hace relativamente pocos años se consideraba que las células endoteliales actuaban como elementos inertes cuya función se limitaría al transporte de la sangre a los tejidos. Sin embargo, en los últimos tiempos se han descrito numerosas funciones fisiológicas a cargo de estas células, con notables propiedades secretoras de sustancias con diversas acciones sobre la hemostasia. De hecho, estas células poseen múltiples mecanismos que ayudan a mantener el flujo sanguíneo y se traducen primariamente en vasoconstricción o vasodilatación. Para inducir la **vasoconstricción** secretan renina (que produce angiotensina II) y endotelinas (fuertemente vasoconstrictoras), e inactivan la bradiquinina y la serotonina (vasodilatadoras). La secreción de endotelinas se estimula por la presencia de hormonas, factores de coagulación derivados de la plaqueta y citoquinas, mientras que el óxido nítrico (ON) y la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) la reducen (Bhatt 1997). Para inducir **vasodilatación**, las células endoteliales sintetizan y liberan factores de relajación como el Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) y PGI<sub>2</sub> que son potentes vasodilatadores e inhibidores de la función plaquetar. Posteriormente se ha constatado que la entidad química que ejerce como EDRF es precisamente el ON, el cual es generado localmente en el endotelio por medio de la ON sintetasa. (Vane y Botting 1991, Shinde y cols. 2000, Darblade y cols. 2000, Marsh y Marsh 2000).

Asimismo, las células endoteliales poseen **propiedades antitrombóticas**, que incluyen mecanismos pasivos y activos. De manera pasiva actúa su carga electrostática negativa, que repele a otros cuerpos con la misma carga, como las plaquetas, y también actúan numerosos componentes del glicocálix. Sin embargo, las propiedades antitrombóticas del endotelio cambian cuando se produce la activación de la célula endotelial, la cual puede inducirse por la pérdida de la integridad vascular, expresión de moléculas de adhesión de los leucocitos, o a la producción de citoquinas (Ruiz de Gopegui y Navarro 2000). Ello se describe con detalle en el apartado 2.1.2.1.

Por otra parte, las células endoteliales secretan diversas sustancias que modulan la **reparación vascular**, como el Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Factor de permeabilidad vascular y Factor de crecimiento de fibroblastos. Estas sustancias actúan mediante la modificación de la proliferación de fibroblastos y alterando el músculo liso. (Hathaway y Goodnight 1993a).

Adicionalmente, el endotelio **elimina de la circulación** numerosos componentes de la sangre (PF<sub>2</sub>, serotonina, nucleótidos adenosina, bradiquinina, angiotensina II), principalmente a nivel pulmonar, ayudando así a mantener un equilibrio entre promotores e inhibidores de la formación del tapón hemostático (Troy 1988).

### **2.1.1.2 Las plaquetas**

Las plaquetas son la primera línea de defensa del organismo cuando se produce un daño vascular, teniendo un papel crucial en la hemostasia. También ejercen un papel esencial en los procesos de inflamación y cicatrización de heridas por medio de interacciones directas con otras células o bien por la liberación de mediadores solubles que modulan la actividad de otras células de la sangre y del endotelio (Jackson 1987). Aunque existen diferencias anatómicas y bioquímicas entre las plaquetas de las diferentes especies, en general las plaquetas se comportan de un modo similar en el proceso de la hemostasia, inflamación y reparación tisular en todos los mamíferos (Gentry 2000b). Sin embargo, se hará hincapié en algunas particularidades de la plaqueta bovina, que se describen con detalle en el apartado 0.

La actividad de las plaquetas durante la hemostasia se basa en cuatro mecanismos fundamentales: la **adhesión**, que implica el desarrollo de la adhesividad de la plaqueta con el colágeno de la pared vascular dañada y es facilitada por la presencia de Mg<sup>++</sup>; la **agregación**, que indica la asociación plaqueta-plaqueta que tiene lugar en presencia de Ca<sup>++</sup>; la **secreción**, que ocurre cuando los productos almacenados en las organelas de la

plaqueta son expulsados al exterior; y la **contracción**, responsable del cambio de forma externa e interna de la plaqueta durante la activación, al tiempo que favorece la secreción, la cual, a su vez será responsable de la agregación masiva e irreversible que forma el tapón hemostático definitivo (White 1994, Weiss 1975a). Estos mecanismos se describen con detalle en el apartado 2.1.2.1.

Las plaquetas bovinas circulantes (no activadas) son unas pequeñas células discoideas y anucleadas, de entre 5 y 7 micras de longitud y 1,5-2 micras de ancho con una superficie lisa y sin la presencia de pseudópodos (Bascuas y Climent 1983, Meyers y cols. 1982, Tablin 2000). Son los elementos más pequeños de la sangre y se generan en la médula ósea a partir de los megacariocitos en un proceso de maduración que dura unos 4 ó 5 días. Cada megacariocito dará lugar a varios miles de plaquetas, de manera que las nuevas plaquetas circulantes son las más grandes y se denominan megatrombocitos y tendrán una vida en circulación de entre 5 y 10 días (Bascuas y Climent 1983, Hathaway 1993). Existen diferencias en las distintas especies de mamíferos en el número de plaquetas, tamaño y granulación y, por regla general, existe una relación inversa entre el número de plaquetas y su tamaño (Hawkey y Dennett 1989).

Las cantidades de plaquetas normalmente presentes en sangre superan en mucho las necesarias para una correcta hemostasia, oscilando, según la especie entre 150.000 y 750.000 plaquetas/ $\mu$ l. El bazo almacena cerca de un tercio de la masa plaquetaria total, liberándose mediante la estimulación -adrenérgica, como sucede duante la actividad física (Meyer y Harvey 2000).

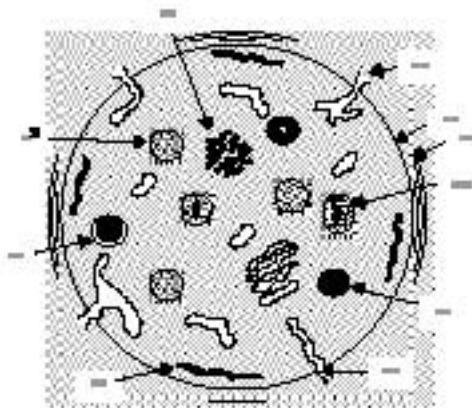
En la plaqueta de la mayoría de los mamíferos se distinguen diferentes estructuras tal como se describen en la Figura 2. En la zona periférica de la plaqueta, se distingue una superficie más exterior, o glicocálix, compuesta principalmente por lípidos (fosfolípidos y colesterol) y proteínas y que contiene asimismo diversos tipos de glicoproteínas que servirán de receptores para estimulantes de la activación, adhesión y agregación

plaquetar (Jackson 1987, White 1994, Ruiz de Gopegui y Feldman 1998). Todos los receptores plaquetares identificados hasta ahora son miembros de la familia de las proteínas de unión transmembranas guanosina trifosfato (GTP) o proteínas G (GP). Estas proteínas tienen un dominio externo hidrofóbico, que actúa como receptor, y un dominio citoplasmático hidrofílico que actúa como efector. Dependiendo del agonista y del tipo de receptor G activado, se inicia una cadena de estimulación o inhibición de reacciones intracelulares (Gentry y cols. 2000a).

Estas GP pertenecen a las familias de las integrinas, glicoproteínas ricas en leucina, inmunoglobulinas y las selectinas. Las **integrinas** son esenciales como receptores para los procesos de adhesión (de plaqueta a la matriz extracelular o unión célula-matriz) y agregación (unión entre plaquetas o unión célula-célula) durante la hemostasia. Entre ellas se encuentra la glicoproteína  $\alpha_2\beta_1$  o GPIa/IIa que constituye el receptor para el colágeno, la  $\alpha_5\beta_1$  o GPIc/IIa, receptor de la laminina, colágeno y fibronectina, la  $\alpha_{IIb}\beta_3$  o GPIIb/IIIa, que tiene afinidad por el fibrinógeno, ADP y FvW, esenciales para el inicio de la hemostasia y la  $\alpha_v\beta_3$  o receptor de la vitronectina en plaquetas activadas. (Bourdeaux 1996). Las **glicoproteínas ricas en leucina** incluyen principalmente al complejo GPIb/IX/V, que contribuye a la carga negativa de la plaqueta y se une a la trombina y al FvW inmovilizado de la matriz subendotelial (no circulante), sirviendo en las fases iniciales de la hemostasia para adherir a las plaquetas a la pared vascular dañada incluso en plaquetas no activadas (Troy 1988, Meyer y Harvey 2000, Tablin 2000).

Al igual que la célula endotelial, la superficie plaquetar está fuertemente cargada negativamente, esta carga actúa como fuerza electrostática repulsiva, por lo que cualquier inductor de su agregación debe superar esta carga para poder ejercer su acción (Sack y Cerutti 1973).

**Figura 2. Estructura microscópica de la plaqueta**  
(Refs: Hathaway y Goodnight 1993a, White 1994)



SC: Sistema canalicular; MT: Microtúbulos; MIT: Mitocondria;  
GL: Gránulos de glucógeno; CD: Cuerpos densos; G $\alpha$ : Gránulos  $\alpha$ ;  
Mb: Membrana celular; TD: Túbulos densos

La zona periférica de la plaqueta contiene asimismo un sistema de túbulos densos y microfilamentos que sirven de citoesqueleto y les permitirían mantener la característica forma elíptica de la plaqueta inactivada así como, probablemente, ayudarían a cambiar de forma durante la activación plaquetar (Weiss 1975a). Este sistema tubular es análogo al retículo sarcoplásmico secuestrador de  $Ca^{++}$  presente en el músculo esquelético. Los microtúbulos o microfilamentos están compuestos por una gran variedad de proteínas contráctiles, que incluyen actina, miosina y proteínas relacionadas. También tienen un sistema canalicular, bien desarrollado en la mayoría de mamíferos, que se continúa con la superficie membranosa y que forma un sistema intercomunicado por toda la plaqueta. Este sistema serviría para ofrecer un acceso rápido al interior de la plaqueta a las proteínas plasmáticas, facilitando la secreción de los gránulos citoplásmicos, así como para mantener las concentraciones adecuadas de  $Ca^{++}$ . Este sistema canalicular también contiene los enzimas necesarios para la síntesis de eicosanoides. En la zona del citoplasma celular existen multitud de componentes contráctiles imprescindibles para el mantenimiento de la forma celular y la emisión de pseudópodos. Estos elementos constituyen el 30-50% del total de la proteína plaquetar (Gentry 1992, White 1994).



En el interior de la plaqueta existen también unos gránulos redondos y moderadamente electrodensos, llamados **gránulos  $\alpha$** , de 0,5-1 micras de diámetro en bóvidos, que contienen sustancias secretadas por los megacariocitos o bien captadas desde el plasma y constan de proteínas adhesivas procoagulantes (FvW, fibrinógeno, fibronectina, trombospondina) factores de coagulación V y XI, inhibidores fibrinolíticos (inhibidor del activador del plasminógeno, inhibidor de la  $\alpha_2$ -plasmina), factor plaquetario 4 (FP4: que neutraliza las moléculas tipo heparina), selectina P y otros componentes incluyendo factores leucotácticos, mitógenos (PDGF y transforming growth factor- $\beta$ ) y de permeabilidad vascular así como  $\alpha$ -trombomodulinas (de función desconocida) (Meyers y cols. 1982, Jackson 1987, Meyer y Harvey 2000, Tablin 2000). Todo este contenido también se secreta con la activación plaquetar y, de hecho, hay quien define a las plaquetas como células secretoras ya que dispone de tres sistemas de secreción dispersos por todo el citoplasma (gránulos- $\alpha$ , gránulos densos y lisosomas) (White 1987).

Hay otros gránulos menos numerosos pero más electrodensos, **denominados gránulos densos** (también VDG o gránulos  $\beta$ ), que se localizan preferentemente en el borde de la plaqueta y que, al igual que los gránulos  $\alpha$  aparecen rodeados de una membrana, almacenando en este caso gran cantidad de nucleótidos que promueven la agregación plaquetar (ATP, ADP, GTP, GDP),  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y serotonina. En estos gránulos, el núcleo electrodenso se sitúa cerca del borde del gránulo, dejando el resto traslúcido. Su diámetro es de 0,5 a 1 micras, sólo ligeramente más grandes que los gránulos  $\alpha$  (Meyers y cols. 1982, Jackson 1987).

También aparecen **gránulos de glucógeno**, de menor tamaño y algunas mitocondrias de pequeño diámetro. Los gránulos de glucógeno aparecen en todas las especies, pero son especialmente numerosos en bóvidos y constituyen la primera fuente de energía de la plaqueta inactivada (Tablin 2000).

En plaquetas bovinas y de otras especies animales también se ha demostrado recientemente la presencia de **lisosomas** con enzimas con actividad hidrolítica al igual que en otros tipos de células (Jackson 1987, Gentry 1992).

Cuando una plaqueta interviene en la formación de un tapón hemostático sufre una serie de procesos de adhesión, activación y cambio de forma que posibilitan que libere muchas sustancias necesarias para la formación del tapón hemostático secundario. Asimismo, las plaquetas promueven la conversión de zimógenos en enzimas en cada paso de la ruta intrínseca de la coagulación al exponer los lugares de unión a proteínas procoagulantes y, en algunos casos, protegen a los enzimas de la coagulación de su inactivación por los inhibidores plasmáticos (Walsh 1985, Meyer y Harvey 2000).

Las plaquetas consumen una gran cantidad de energía durante la agregación. La glucosa es su principal fuente energética y tienen glucólisis anaeróbica activa y sintetizan y emplean grandes cantidades de glucógeno. A diferencia de los glóbulos rojos (también anucleados), las plaquetas poseen mitocondrias y completan el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

Un mediador de la actividad energética de la plaqueta es la adenosin trifosfatasa (ATPasa), dependiente del  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$ . En efecto, en los cuerpos densos o gránulos se almacenan el 50% de los nucleótidos adenina que, sumado al ATP, incluyen cantidades considerables de ADP,  $Ca^{++}$  y serotonina, que se segregan al exterior durante la reacción de liberación (degranulación), que se describe en el apartado 2.1.2.1.

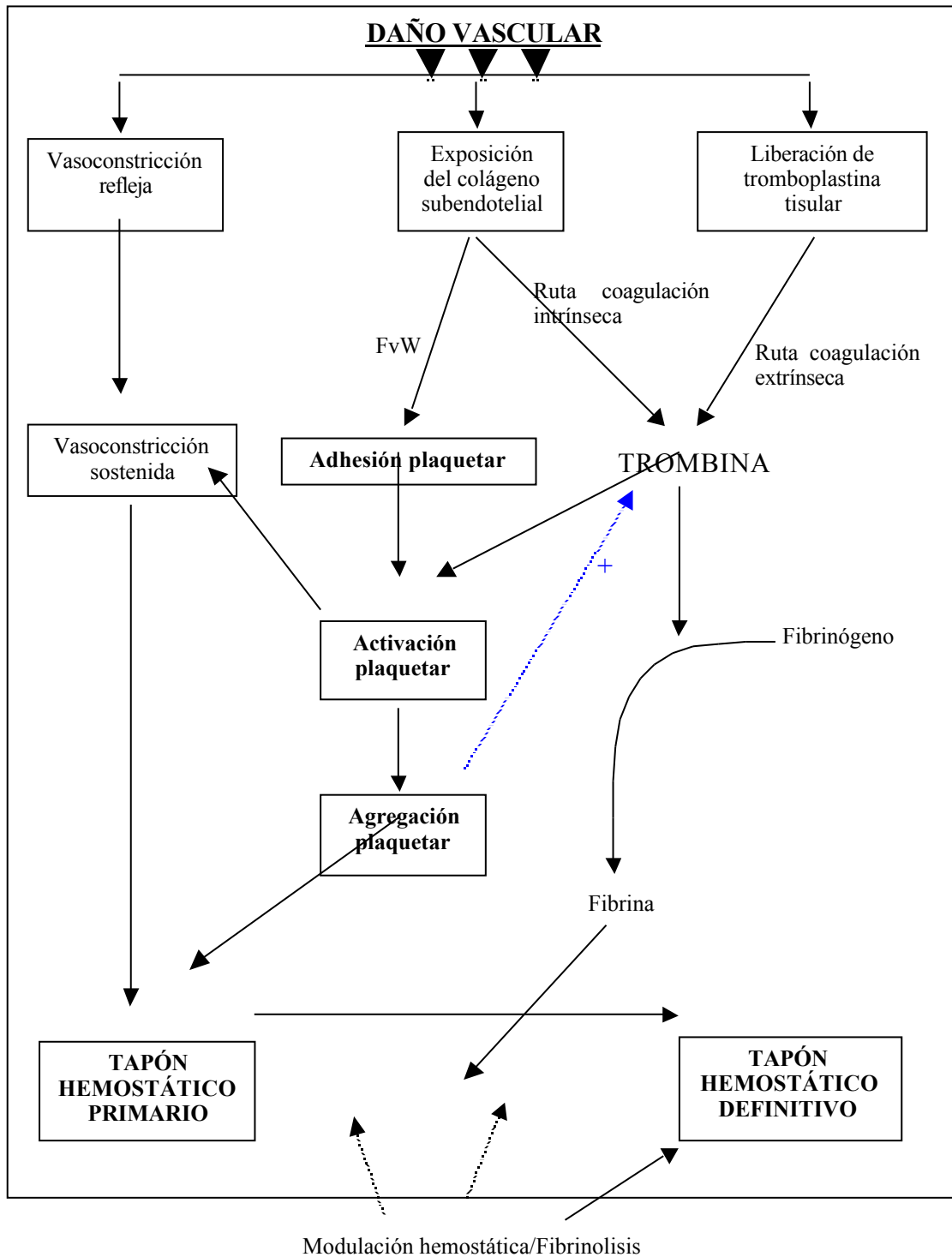
### **2.1.2 La hemostasia primaria**

La primera respuesta de una arteria o arteriola a una lesión es una vasoconstricción refleja (fase vascular de la hemostasia). Inmediatamente se produce una interacción entre las plaquetas, el FvW y el subendotelio vascular (fase plaquetar). El resultado de estas

interacciones, prolonga la vasoconstricción y cubre el área lesional con una masa de plaquetas entremezcladas que se denomina tapón hemostático primario o temporal. El proceso que culmina con la formación de este tapón hemostático primario constituye la **hemostasia primaria** y suele ser suficiente para controlar las hemorragias ocasionadas por lesiones vasculares de tipo leve o bien de pequeños vasos.

**La vasoconstricción** refleja o espasmo vascular es un mecanismo que se traduce en una reducción de la luz del vaso lesionado para paliar al máximo la pérdida de sangre. Esta vasoconstricción es tan rápida que se ha propuesto asimismo la mediación de un reflejo axiónico, y puede ser suficiente para obliterar totalmente la luz de arterias o arteriolas (dotadas de capas musculares bien desarrolladas) (Robbins 1974). La vasoconstricción, no puede producirse en capilares, al carecer de capa muscular, ni es tampoco muy eficaz en venas de paredes delgadas. Adicionalmente el TXA<sub>2</sub> liberado por las plaquetas activadas no sólo causa una marcada agregación trombocítica sino que también ayuda a mantener la vasoconstricción (Green 1997). Sin embargo, el efecto vasoconstrictor del TXA<sub>2</sub> es breve, puesto que su activación en la ruta plaquetar de los eicosanoides conduce a la síntesis de PGI<sub>2</sub>, con actividad vasodilatadora (Angelos y Hamilton 1986). No obstante, este espasmo puede prolongarse cierto tiempo, durante el cual se desencadenan los otros fenómenos de la hemostasia sin la participación de los cuales se repetiría la hemorragia. No en vano, la disminución del flujo sanguíneo que se produce mediante la vasoconstricción, favorece enormemente el contacto entre las plaquetas y la superficie endotelial del vaso dañado para facilitar la formación del tapón hemostático primario.

Figura 3. Esquema general de los sistemas hemostáticos



Refs. Troy 1988, Green 1997, Meyer y Harvey 2000

La **formación del tapón hemostático** se inicia cuando la superficie endotelial del vaso se daña y el subendotelio, y el colágeno que contiene, queda expuesto a la sangre circulante. En ella circulan las plaquetas que tienden a adherirse sobre el área lesionada mediante una variedad de mecanismos. En la mayoría de mamíferos los principales mediadores de la adhesión plaquetar son el FvW y el fibrinógeno, si bien otras proteínas tales como la laminina, trombospondina y vitronectina pueden también ayudar a la adhesión (Hathaway y Goodnight 1993a). El FvW es una proteína circulante (aunque también se encuentra en los gránulos plaquetares) que además de ser portadora del factor VIII (que actúa en la hemostasia secundaria o coagulación de la sangre), se une a los receptores subendoteliales y, a continuación, a los receptores glicoproteicos de las plaquetas específicos del FvW (GPIb/IX/V y GPIIb/IIIa), iniciando así la adhesión de las mismas. El FvW se sintetiza en la célula endotelial y se almacena en unas vesículas secretoras llamadas Cuerpos Weibel-Palade. Su liberación se induce por la presencia de trombina, histamina o fibrina (Meyer y Harvey 2000, Ruiz de Gopegui y Navarro 2000).

Las plaquetas circulantes no interactúan normalmente ni entre ellas ni con otras células ni con el endotelio vascular. Como ya se ha descrito, la repulsión natural entre las plaquetas y el endotelio se atribuye en parte a cargas eléctricas similares sobre sus superficies. En el caso de que exista un traumatismo, el metabolismo alterado del AA en las células endoteliales produce PGI<sub>2</sub>, de efecto vasodilatador y se opone al efecto aglutinante de plaquetas del TXA<sub>2</sub>. De este modo las funciones fisiológicas del endotelio normal promueven un aumento del flujo sanguíneo en la zona lesionada, aumentando su interacción con los factores de la coagulación. Estos forman complejos irreversibles que son barridos por el flujo sanguíneo y depurados por el hígado (Green 1997). Por su parte, cuando se producen alteraciones del endotelio, que en condiciones normales es antitrombogénico, las plaquetas se activan y se adhieren rápidamente a la superficie dañada y, a su vez, las plaquetas adheridas inducirán a otras plaquetas circulantes a hacer lo mismo mediante toda una cascada de reacciones (Gentry 2000b).

### ***2.1.2.1 Activación de las plaquetas***

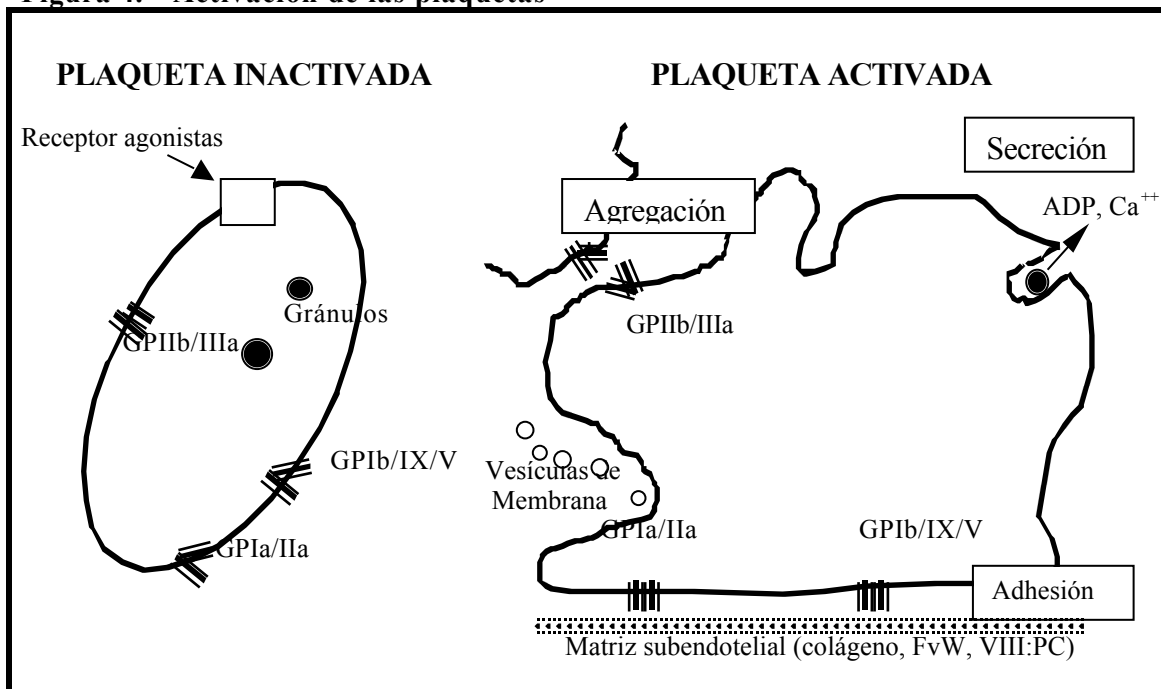
Cuando las plaquetas se exponen a partículas o superficies extrañas (el colágeno del subendotelio dañado) o son estimuladas por agonistas (ej. Colágeno, trombina, epinefrina, ADP, serotonina, TXA<sub>2</sub>, calcio, Factor de activación plaquetar (PAF), etc.) pierden rápidamente su forma discoide (descrita en la Figura 2), se vuelven más esféricas y extienden pseudópodos. Este proceso se produce mediante la alteración de la trama de filamentos de actina del citoesqueleto y se conoce como la **activación de las plaquetas** (Figura 4).

Parece ser que el contacto inicial entre la plaqueta y el subendotelio está mediado inicialmente por la interacción entre el FvW inmovilizado y los receptores plaquetares GPIb del complejo GPIb/IX/V (que están siempre activados en las plaquetas circulantes). La forma discoide de las plaquetas inactivas se mantiene gracias a los haces circunferenciales de microtúbulos situados debajo de la membrana y a una extensa red de filamentos de actina que forman el esqueleto de la membrana plaquetaria (Weiss 1975a). Tras unirse con el FvW los haces microtubulares se despolimerizan e incrementan la polimerización de la actina, generando la formación de pseudópodos de modo que se exponen los fosfolípidos de membrana (FP3) y los receptores glicoproteicos. En las plaquetas que sufren estos cambios conformacionales se activan los receptores de la glicoproteína GPIIb/IIIa, que sirven para su unión al fibrinógeno y al FvW. El fibrinógeno actuaría formando puentes entre receptores en plaquetas adyacentes y con el subendotelio, lo que conduce a la unión de las plaquetas entre sí y a la diseminación de la adhesión plaquetar. (Hathaway y Goodnight 1993a, Kallis y cols. 1994, Gentry 2000b). Otras sustancias producidas por la célula endotelial intacta tales como la PGI<sub>2</sub> o el ON (EDRF) son inhibidores naturales de la adhesión plaquetaria (Hathaway 1993a).

La estimulación continuada hace que las plaquetas se extiendan adoptando formas irregulares (“spread forms”) en las que el citoplasma llena los pseudópodos, mientras que las organelas se concentran en el centro de la célula y los gránulos se funden con el sistema canalicular, el cual a su vez se funde con la membrana exterior, lo cual se traduce en una mayor superficie celular. Estos ajustes muestran nuevos receptores provenientes de las membranas de los gránulos fusionados (Gentry 1992).

Durante este proceso, los cuerpos densos y gránulos son triturados juntos (fusión y disolución) por una red de microtúbulos y microfilamentos circundantes y sus contenidos son descargados por medio del sistema canalicular abierto. La contracción de las plaquetas facilita todo el proceso de manera que en 10 minutos desaparece el 70% de los gránulos- y en 40 minutos el 97% (Jackson 1987, Meyer y Harvey 2000).

Figura 4. Activación de las plaquetas



Refs.: Hathaway y Goodnight 1993a, Meyer y Harvey 2000

El proceso bioquímico intracelular que conduce a la activación de las plaquetas se basa principalmente en la ruta de los eicosanoides y en su influencia en los niveles de

Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPc) en conjunción con el sistema vesicular que regula el nivel citoplásmico de  $Ca^{++}$  (Weiss 1975a).

**La ruta de los eicosanoides** comienza con la activación de la fosfolipasa  $A_2$ , que estimula la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana celular (fosfatidilcolina) y la liberación del Ácido Araquidónico (AA). El AA es el precursor de todos los eicosanoides y es el ácido graso mayoritario en la membrana celular de la plaqueta, si bien en proporciones variables entre las diferentes especies animales (Gentry y cols. 2000a). Al ser metabolizado, el AA liberado desemboca en la formación del  $TXA_2$  y de diversas prostaglandinas, por la ruta de la cicloxigenasa (**Figura 6**).

**Figura 5. Proceso de activación de las plaquetas bovinas (Gentry 2000b):**



A: Plaquetas bovinas inactivadas. B: Tras la estimulación con ADP las plaquetas pierden su forma discoide e inician la formación de pseudópodos o filamentos ( $\rightarrow$ ). Se inicia la adhesión plaquetar. C: Tras la estimulación con trombina se aumenta la adhesión, la formación de filamentos y la formación de agregados plaquetares ( $\star$ )

El  $TXA_2$  actúa como mensajero entre e intra plaquetas favoreciendo su **agregación** así como aumentando la vasoconstricción y es el metabolito mayoritario en todas las especies. Sin embargo, la cantidad producida varía según el tipo de agonista y la especie animal, de modo que las plaquetas humanas, equinas y felinas producen el doble de  $TXA_2$  tras la estimulación con trombina que las plaquetas bovinas, porcinas u ovinas, pudiendo también depender de la raza o la estirpe (Angelos y Hamilton 1986). La capacidad agonista del AA o del  $TXA_2$  varía también con la especie, siendo mucho más eficaces en hombre, conejo, caballo o cobaya que en plaquetas de bóvidos, ratas, elefantes o algunas razas de perros. Según Meyers y cols. (1980) las plaquetas bovinas y



porcinas no responderían en absoluto a la estimulación con trombina o AA (a diferencia de las plaquetas equinas, humanas, felinas o caninas).

Según Gentry (2000b), a excepción de la trombina y el colágeno, existe una gran variedad de respuestas a la agregación plaquetar inducida por otros agonistas en distintas especies. Estas variaciones pueden deberse al grado de desarrollo del sistema canalicular, número y tipo de receptores, a los agonistas en la membrana plaquetar y a la habilidad de la plaqueta de responder al TXA<sub>2</sub>.

Sin embargo, según Meyers y cols (1980), estas diferencias interespecies, determinadas “in vitro” tienen muy poca relevancia en la fisiología del animal vivo, en el que numerosos agonistas actúan conjuntamente y en presencia de diferentes concentraciones de Ca<sup>++</sup>. Aún así, estas diferencias pueden ser determinantes en la ineficacia de determinadas drogas como AINEs tales como la aspirina, que fracasarían en la reducción de la agregación plaquetar en aquellas especies en que dicha agregación puede tener lugar a través de rutas independientes del AA (Gentry y cols. 2000a).

Aunque en todas las especies se produce alguna cantidad de TXA<sub>2</sub>, en el caso de los bóvidos parece que la ruta del AA no está bien desarrollada, respondiendo mucho mejor a otros agonistas como el colágeno, el ADP o el PAF (Cheryk y cols. 1998). El PAF es un fosfolípido con gran capacidad de inducir la agregación plaquetar al tiempo que es un mediador de la inflamación en diversas enfermedades, como asma, o hipertensión pulmonar (Bastos da Silva y cols. 1996). La fosfolipasa A<sub>2</sub> también interviene en la generación del PAF a partir de la fosfatidilcolina de la membrana plaquetar (Meyer y Harvey 2000). Aunque en diferente grado según las especies, su acción consiste en inducir la activación y agregación plaquetar (excepto en ratones, ratas y hamsters), ser mediador de las relaciones de las plaquetas con otras células (Gentry y cols. 1992), así como iniciador de la permeabilidad capilar (Liggitt y cols. 1984). Asimismo, el PAF es un fosfolípido que juega un papel importante en la respuesta inflamatoria y anafiláctica

en diversos tipos de células (basófilos, neutrófilos, macrófagos o células endoteliales). En bovino su acción agregante plaquetar es muy evidente aunque independiente de la ruta del AA y TXA<sub>2</sub>, motivo por el cual se ha dicho que los inhibidores de la ciclooxigenasa o de la lipooxigenasa no previenen la respuesta agregante y procoagulante de las plaquetas bovinas estimuladas por el PAF (Gentry y cols. 2000a, Liggitt y cols. 1984). Cargill y cols. demostraron en 1983 la capacidad del PAF de inducir la liberación de ATP de los gránulos densos en presencia de una mínima concentración de Ca<sup>++</sup> extracelular, en diversas especies animales.

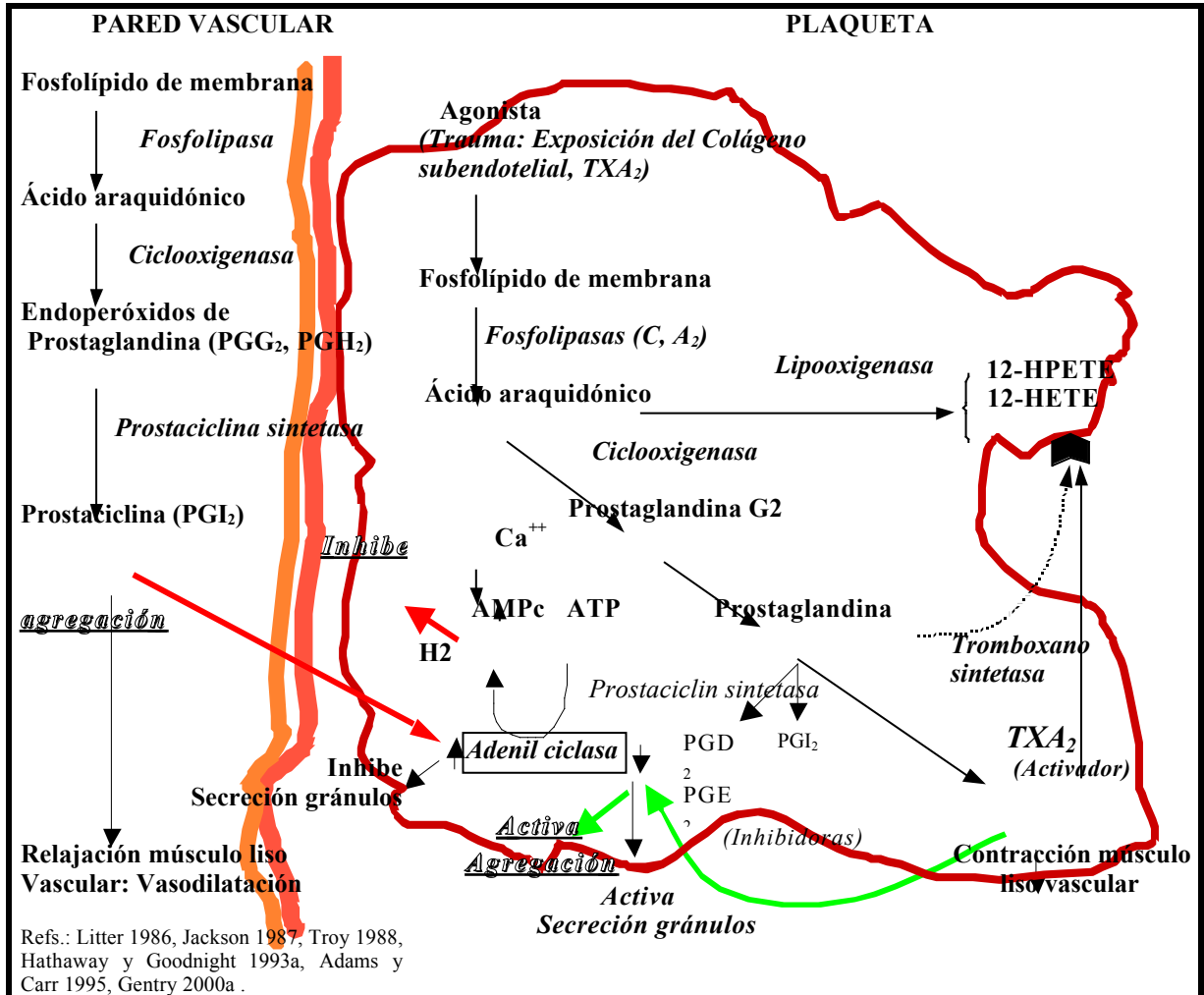
Por otra parte, el **AMPc** se forma por acción de la adenilciclase, que es inhibida por una variedad de antagonistas que, por tanto, provocarán la liberación de Ca<sup>++</sup> y la contracción de la plaqueta. La elevación del nivel de Ca<sup>++</sup> intracelular, como resultado de estímulos directos extracelulares o bien por su liberación a partir del sistema tubular denso y, en algunas especies, de los gránulos densos, es uno de los eventos bioquímicos críticos para la activación de la plaqueta, y ocurre en todas las especies como consecuencia de la acción de todo tipo de activadores plaquetares. El Ca<sup>++</sup> está directamente implicado en la regulación de los enzimas fosfolipasa C y A<sub>2</sub> y, cuando aumenta su concentración, inicia la cadena de reacciones de fosforilación de proteínas de la membrana plaquetar en la que se activan los receptores y enzimas favorecedores de la formación de trombina (Gentry y cols. 2000a).

Las prostaglandinas (PGE<sub>1</sub>, PGD<sub>2</sub>), y principalmente la PGI<sub>2</sub>, incrementan el AMPc y suprimen la capacidad de respuesta de la plaqueta al disminuir los niveles de Ca<sup>++</sup>. La PGI<sub>2</sub> presenta una actividad antiagregante entre 20 y 50 veces superior a las otras prostaglandinas según la especie. Si bien en las plaquetas sus niveles son moderados, en las células endoteliales constituye un metabolito mayoritario del AA y actuaría, en todas las especies, como inhibidora de la agregación plaquetar (Whittle 1987, Gentry y cols. 2000a). Hay que tener en cuenta que cualquier perturbación o daño a la membrana de la célula endotelial desemboca en la formación de PGI<sub>2</sub>, por lo que hay muchos agentes

físicos y mediadores endógenos y exógenos que estimulan su generación. Se ha descrito que la formación de PGI<sub>2</sub> se estimula hasta 100 veces sobre su nivel basal por la presencia de agonistas plaquetares, mediadores de la inflamación como la histamina y la bradikina y por otros mediadores solubles del AA, como el ADP u otras sustancias liberadas por plaquetas estimuladas tales como serotonina, factor de crecimiento plaquetar, interleukina-1 y nucleótidos adenina (Gentry y cols. 2000a). Por otra parte, el TXA<sub>2</sub> inhibe la acumulación de AMPc, mostrando actividad procoagulante. El equilibrio entre la acción estimuladora del AMPc de la PGI<sub>2</sub> del endotelio vascular y la actividad inhibidora del TXA<sub>2</sub> sobre el AMPc plaquetar será el que a la postre regule la agregación plaquetar (Jackson 1987, Adams 1995).

Estos mismos estímulos también producen la formación endógena de ON en la célula endotelial (Vane y Botting 1991). El ON induce la activación de ciertas protein-kinasas que hacen disminuir la concentración intracelular de Ca<sup>++</sup> plaquetar y se sintetiza en cantidad suficiente como para influir en el tono vascular de forma sostenida y para inhibir la reactividad plaquetar. Así pues, mediante estímulos plaquetares que influyen sobre la síntesis de PGI<sub>2</sub> y ON a nivel endotelial, las propias plaquetas activadas pueden iniciar el proceso de retroalimentación negativa para su propia inhibición, fenómeno que modulará la formación del tapón hemostático primario (Gentry y cols. 2000<sup>a</sup>).

**Figura 6. Ruta de los eicosanoides**



**Tabla 1. Principales factores que intervienen en la hemostasia primaria**

Ácido Araquidónico	El ácido graso mayoritario en la membrana celular, precursor de todos los eicosanoides	AA
Adenosin difosfatasa	Ectoenzima producida por la célula endotelial que inactiva el ADP	ADPasa
Angiotensina II	Producida por la renina induce vasoconstricción.	ATII
Bradiquinina	Vasodilatador inactivado por la célula endotelial para inducir vasoconstricción	
Complejo GPIb/IX/V	Glicoproteína rica en leucina. Receptor de la trombina y del FvW subendotelial en la adhesión plaquetar	GPIb/IX/V CD42b+CD42c/CD42a/CD42d
Elastina	Proteína adhesiva de la membrana subendotelial	
Endotelinas 1, 2, 3	Secretadas por las células endoteliales, inducen vasoconstricción. Secretadas por la estimulación de factores de coagulación y citoquinas. ON y PGI <sub>2</sub> la reducen.	
Endotelium Derived Relaxing Factor/ Óxido nítrico	Producido por las células endoteliales. Induce vasodilatación e inhibición de la función plaquetar	EDRF ON
Factor de Activación Plaquetar	Fosfolípido mediador de la inflamación con gran capacidad de inducir la agregación plaquetar	PAF
Factor de von Willebrand	Proteína adhesiva de la membrana subendotelial. Esencial para la adecuada adhesión plaquetar	FvW
Factor plaquetar 4	Presente en los gránulos . Neutraliza moléculas tipo heparina	FP4
Fibronectina	Proteína adhesiva de la membrana subendotelial y de los gránulos plaquetares. Promueve la adhesión, agregación y aglutinación plaquetar. Mediador de la reparación tisular	
Fosfolipasa A <sub>2</sub>	Enzima que estimula la hidrólisis de los fosfolípidos y la liberación de AA	
Glicoproteína <sub>2 1</sub>	Integrina. Receptor plaquetar para el colágeno.	GPIa/IIa
Glicoproteína <sub>5 1</sub>	Integrina. Receptor plaquetar para la laminina, colágeno y fibronectina.	GPIc/IIa
Glicoproteína <sub>IIb 3a</sub>	Integrina. Receptor plaquetar para el fibrinógeno, ADP y FvW.	GPIIb/IIIa CD41/CD61
Glicoproteína <sub>v 3</sub>	Integrina. Receptor plaquetar para la vitronectina en plaquetas activadas.	
Laminina	Proteína adhesiva de la membrana subendotelial	
Prostaciclina	Prostaglandina derivada del AA. Reduce la secreción de endotelinas. Induce vasodilatación e inhibe la función plaquetar. Antagonista del TXA <sub>2</sub>	PGI <sub>2</sub>
Prostaglandina F <sub>2</sub>	Prostaglandina derivada del AA	PF <sub>2</sub>
Proteínas G o Proteínas de unión transmembranas guanosina trifosfato.	Familia de proteínas a la que pertenecen los receptores plaquetares. Incluyen Integrinas, Glicoproteínas ricas en leucina, inmunoglobulinas y selectinas.	GP ó GTP
Renina	Secretada por las células endoteliales, produce ATII que induce vasoconstricción.	
Serotonina	Vasodilatador inactivado por la célula endotelial para inducir vasoconstricción	
Trombospondina	Proteína adhesiva presente en los gránulos plaquetares y en la membrana subendotelial	
Tromboxano A <sub>2</sub>	Prostaglandina producida por las plaquetas y antagonista de PGI <sub>2</sub>	TXA <sub>2</sub>
Vitronectina	Proteína adhesiva de la membrana subendotelial.	

### ***2.1.2.2 El tapón hemostático primario***

La PGI<sub>2</sub> ejerce su efecto a nivel local, sin entrar en la circulación de forma efectiva (concentraciones plasmáticas inferiores a 3 pg/ml), de manera que en el endotelio produce por un lado la relajación del músculo liso de la media y en el lumen evita que las plaquetas se agreguen sobre las células endoteliales. Este efecto es mediado por un aumento del AMPc tanto en músculo como en plaquetas (Vane y Botting 1991). Parece ser que su actuación se relaciona con la presencia de un receptor específico de membrana unido a una proteína G agonista, que a su vez estimula la adenil ciclasa de la membrana plaquetar, de modo que todas las respuestas plaquetares inducidas por la PGI<sub>2</sub> parecen estar mediadas por la elevación de la concentración intracelular de AMPc. Esto reduce la reactividad de la plaqueta al interferir en el metabolismo de los fosfolípidos, reducir la expresión del GPIIb/IIIa (lo que reduce la unión de agonistas a la membrana) y la magnitud de la elevación del Ca<sup>++</sup> libre en el citosol (Gentry y cols. 2000a).

El ON actúa también como una hormona local, afectando únicamente a la zona donde se ha generado, siendo inactivado rápidamente por la hemoglobina. La producción basal de ON produce vasodilatación al relajar la musculatura lisa de los vasos e inhibe la agregación y la adhesión plaquetar. Existe, por tanto, un marcado sinergismo entre el efecto antiagregante de la PGI<sub>2</sub> y bajas concentraciones de ON, de manera que ante un daño del endotelio se produciría un descenso de ON que permitiría la adhesión plaquetar, pero la generación de PGI<sub>2</sub> por el subendotelio continuaría inhibiendo la formación de agregados plaquetares. Cuando un vaso sufre daños mayores tanto el ON como la prostaciclina actuarían para prevenir una agregación intraluminal de plaquetas, pero permitirían su adhesión extra-luminal, convirtiéndose en un mecanismo de defensa frente a la trombosis y la arteriosclerosis. No en vano se ha observado que con la edad, diabetes y arteriosclerosis, se produce un descenso de la capacidad de los vasos de producir PGI<sub>2</sub>, lo cual coincide con un aumento de episodios de trombosis (Vane y

Botting 1991). Por otra parte, la célula endotelial activada puede también suprimir la reactividad de las plaquetas incrementando la producción de ON (Gentry y cols. 2000a). Las plaquetas, una vez activadas, liberan el contenido de sus gránulos, incluyendo los ligantes fibrinógeno, FvW, ADP y otras sustancias (Hathaway 1993). El ADP es un potente agente proagregante y su liberación estimula a otras plaquetas a activarse y a agregarse al tapón hemostático primario (Angelos y Hamilton 1986). Estas plaquetas, a su vez, liberarán más ADP, generando una reacción en cadena que atraerá nuevas plaquetas al tapón. A diferencia de la reacción iniciada por el colágeno subendotelial, la agregación provocada por el ADP requiere la presencia de cationes divalentes y fibrinógeno, posiblemente también de trombina en pequeñas cantidades (Robbins 1974). Muchos inductores de la agregación plaquetar actúan mediante la liberación de ADP plaquetar (Sack y Cerutty 1973).

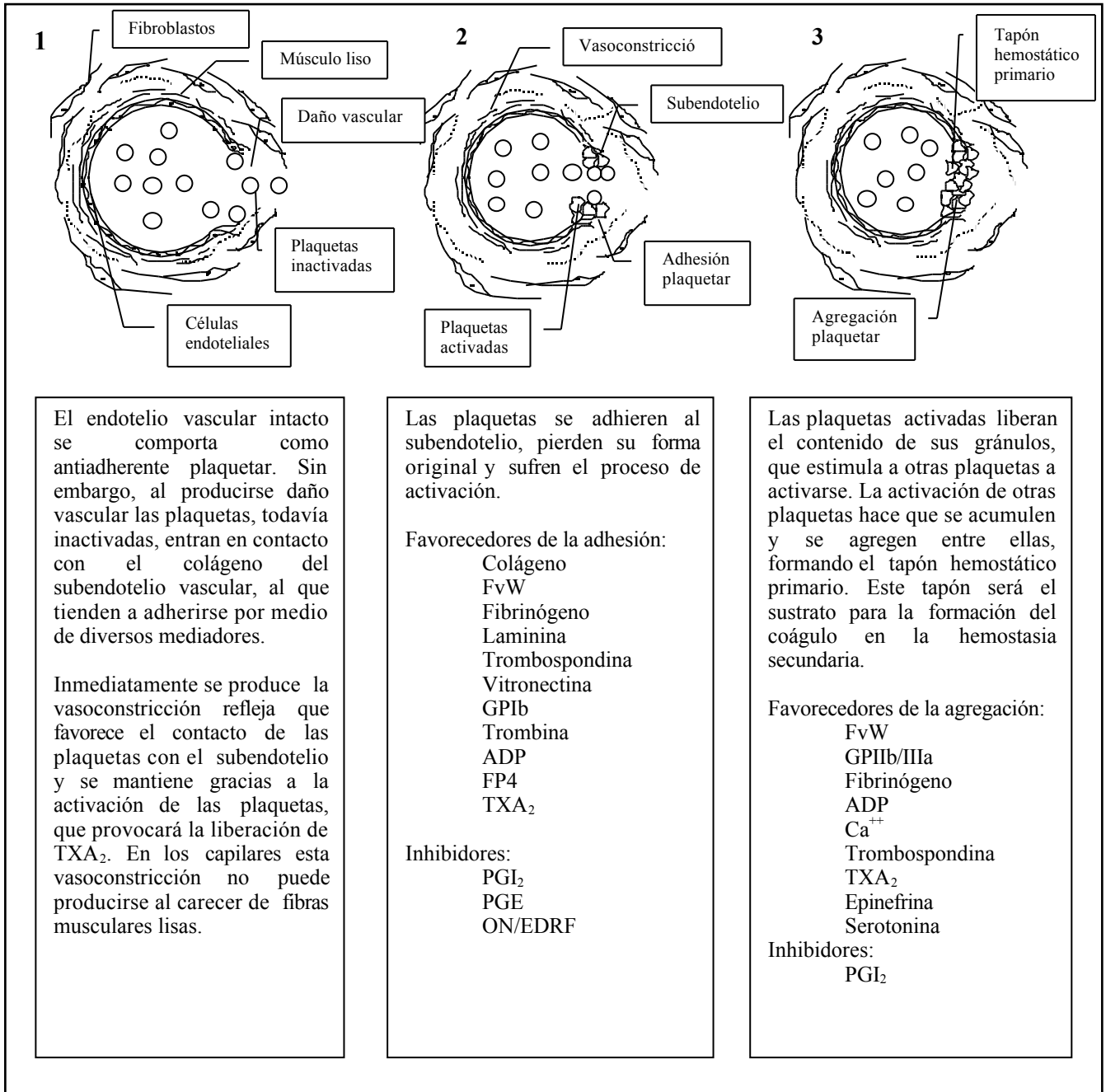
La glicoproteína GP IIb/IIIa es el receptor que reconoce al fibrinógeno tras la exposición de los lugares de unión durante la fase de activación de las plaquetas. El fibrinógeno hace de puente entre receptores de plaquetas adyacentes (en presencia de  $Ca^{++}$ ), aunque para la estabilización de esta unión se precisa el concurso de la trombopospondina. Este fenómeno se denomina **agregación** de las plaquetas (Hathaway 1993). De este modo, las plaquetas se adhieren al colágeno subendotelial y se agregan entre ellas, formando un tapón hemostático primario. Este tapón es efímero, con una duración de segundos o a lo sumo algunos minutos y localizado en el área de la superficie lesionada. Hasta este momento, el tapón es todavía reversible y puede disgregarse por el flujo constante de sangre que atraviesa la zona de acumulación (Robbins 1974). Sin embargo, las plaquetas agregadas contienen una variedad de factores de coagulación, que muestran un ambiente óptimo para que se inicie la Hemostasia secundaria o Coagulación de la sangre, que culminará con un tapón hemostático duradero (Couto 1999). La agregación primaria es reversible, mientras que la agregación secundaria va acompañada de la secreción del contenido de los gránulos y es irreversible (Bondy y Gentry 1989).

Tal y como se ha comentado anteriormente, este tapón es suficiente para controlar hemorragias producidas por lesiones de tipo leve o bien lesiones de vasos capilares. No obstante, la importancia del tapón hemostático primario reside en el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales, sin que medie una lesión visible. En efecto, millones de células endoteliales mueren y se desprenden cada día en todo tipo de animales y, por lo tanto, dejan expuestas pequeñas áreas del subendotelio a las plaquetas circulantes. En condiciones fisiológicas normales se forman múltiples tapones hemostáticos primarios que evitan las hemorragias que la muerte de estas células pudiera ocasionar (Troy 1988). En casos de algún defecto de la hemostasia primaria (ej. Trombocitopenia, disfunciones plaquetares o vasculopatías), la sangre se extravasa de pequeños vasos durante unos segundos, o incluso minutos, hasta que se forma el tapón hemostático secundario. Si estas pequeñas hemorragias se producen a nivel superficial, se pueden observar petequias o equimosis. Asimismo, estos animales sangran inmediatamente tras retirar la aguja en una venupunción (Couto 1999).

Idealmente, la reacción hemostática debe ser suficiente para limitar la hemorragia a nivel de la región lesionada aunque permitiendo una perfusión tisular adecuada, es decir, evitando la aparición de trombosis diseminadas. Para ello, aparte de la acción de sistema fibrinolítico descrita en el apartado **2.1.4**, el mecanismo de la hemostasia está regulado por un gran número de reacciones limitantes que normalmente impiden que se formen trombos en el interior de los vasos lesionados manteniendo de este modo el estado líquido de la sangre. Este hecho destaca la gran importancia de los inhibidores hemostáticos naturales en la modulación de la respuesta hemostática. Entre dichos inhibidores se ha destacado a la PGI<sub>2</sub> (Angelos y Hamilton 1986, Gentry y cols. 2000a).



Figura 7. Esquema general del mecanismo de la hemostasia primaria.



Particularidades de la plaqueta bovina.

Las plaquetas bovinas, como las del resto de los mamíferos, poseen forma discoide gracias a su sistema de microtúbulos y continen gránulos-, granulos densos, glucógeno y mitocondrias. Existen varias diferencias entre la plaqueta bovina y la humana tales como el tamaño, que es ligeramente menor, si bien son más numerosas, poseen menos cuerpos densos y su citoplasma está dominado por gránulos de tamaño dos o tres veces mayor que los de las plaquetas humanas. Sin embargo, el mayor rasgo diferencial de las plaquetas bovinas reside en no poseer el característico sistema canalicular de las plaquetas humanas y de la mayoría de los mamíferos, por lo que los cuerpos densos descargan sus contenidos mediante su fusión con la membrana plaquetar externa (Zucker-Franklin y cols. 1985, White 1994). En cambio el sistema tubular denso está completamente desarrollado (White 1987, Bastos da Silva y cols. 1998).

Las plaquetas humanas cuando entran en contacto con alguna superficie, tanto in vivo como in vitro, pierden su forma discoide volviéndose esféricas y extienden largos pseudópodos mientras adoptan una forma dendrítica. A medida que continúa la activación pierden su forma esférica aplastándose contra la superficie, mientras que el citoplasma rellena los espacios dejados por los pseudópodos y transformándose en una capa continua de plaquetas. Las plaquetas bovinas también sufren cambios de forma durante su activación por contacto, sin embargo en lugar de pseudópodos desarrollan unas formas filiformes sin rellenar con citoplasma los espacios que dejan entre ellos. Grouse y cols. (1990) postulan que estas diferencias pueden deberse a la carencia del sistema canalicular en la plaqueta bovina ya que este podría actuar como un reservorio de membrana para adaptarse a una forma más extendida. Sin embargo, según los mismos autores, los microtúbulos circulares que otorgan la característica forma discoide a las plaquetas son más resistentes a la deformación y a su desamblaje en el caso de los bóvidos que en humanos u otras especies. Esta podría constituir una limitación en la magnitud de los cambios de forma de la plaqueta durante su activación. Asimismo, en las

plaquetas bovinas, los gránulos no migran hacia el centro de la célula, sino hacia su superficie, fusionándose en último término con la membrana para poder expulsar su contenido al exterior (Gentry 1992).

Los mecanismos de la adhesión son similares entre las diferentes especies de mamíferos, si bien la agregación de unas plaquetas con otras puede variar. Así, en las especies con un sistema canalicular poco desarrollado (caso de los bóvidos) se produce una menor proliferación de pseudópodos y migración de los gránulos\_ hasta liberarse en la membrana, respecto al resto de especies que sí lo tienen. La necesidad de producirse la migración de los gránulos hasta la superficie celular para secretar sus contenidos al plasma limita la velocidad de la reacción de las plaquetas vecinas (Gentry 2000b). Ello conlleva una menor sensibilidad a los agonistas por parte de la plaqueta bovina, que al carecer de sistema canalicular secretan el contenido de los gránulos densos con mayor dificultad al tiempo que exponen menos receptores GPIIb/IIIa-fibrinógeno. Todo ello resulta en una falta de agregación o en un grado de agregación reversible a agonistas que en otras especies producen una agregación irreversible.

Para contrarrestar esta carencia la plaqueta bovina debe de utilizar otro sistema de excrección de los gránulos. Así, los gránulos de la plaqueta bovina inactivada se distribuyen en una zona más periférica que en la plaqueta humana, frecuentemente en contacto con la membrana celular. La mayoría tampoco se mueven en dirección al centro tras la estimulación de la trombina, a diferencia de otras especies. De hecho, muchos gránulos de la plaqueta bovina se fusionan con la membrana celular sin utilizar ningún canal intermediario. Sin embargo, la plaqueta bovina forma unos nuevos canales rápidamente durante su activación que, aunque su estructura es algo más simple que los de otras especies, se utilizarían como conductos de secrección del contenido de los gránulos, por lo que el sistema de secrección de la plaqueta bovina no sería tan diferente al del resto de especies como parecería a primera vista (Bastos da Silva 1998, White 1987).

A pesar de estas diferencias ultraestructurales, los cambios en cuanto a la composición lipídica de la membrana plaquetar y su metabolismo en las distintas especies animales, parecen ser de naturaleza cuantitativa más que cualitativa. Así, se ha comprobado que el “turnover” de fosfolípidos en las plaquetas bovinas activadas es similar al de las humanas aunque hay algunas diferencias en cuanto a la composición en ácidos grasos libres (Gentry y cols. 2000a).

Al igual que en otras especies animales la administración de aspirina a bóvidos produce un descenso en la producción de TXA<sub>2</sub> durante la activación plaquetar. Sin embargo, este descenso no va acompañado de ninguna alteración en la rapidez o la intensidad de la agregación plaquetar, lo que confirma que la formación de TXA<sub>2</sub> no es la ruta bioquímica principal en la agregación de las plaquetas bovinas (Gentry y cols. 1989). No hay correlación entre la producción de TXA<sub>2</sub> y el grado de agregación en plaquetas bovinas e incluso se ha comprobado que la agregación de las plaquetas bovinas depende de la movilización del Ca<sup>++</sup> y de una ruta necesariamente diferente a la del metabolismo del AA. A diferencia de otras especies, las plaquetas bovinas son insensibles a los efectos inhibitorios de la aspirina, indometacina y dipyridamol (Bondy y Gentry 1989, Swier y cols. 1989).

En general, la plaqueta bovina parece ser menos receptiva a los estímulos que las plaquetas de la mayoría de las otras especies de mamíferos o del hombre (Marzec y cols. 1975). En estudios de agregometría comparativos con otras especies se ha demostrado que las plaquetas bovinas no responden a agonistas eficaces en el perro o en el hombre tales como la ristocetina, AA o epinefrina, y responden sólo de forma parcial a la estimulación con colágeno (Soloviev y cols. 1999). La trombina es una excepción, ya que produce una agregación irreversible y monofásica al igual que en otros mamíferos. Las plaquetas bovinas precisan de 5 a 10 veces más ADP que las de ovino, humanos o primates para alcanzar la máxima agregación. La sensibilidad de la plaqueta bovina al PAF es similar a la de otras especies; sin embargo, se produce una agregación reversible,

mientras que en la mayoría de mamíferos es irreversible. Finalmente, aunque las plaquetas de algunas especies sólo responden a altas concentraciones de AA, las plaquetas bovinas no muestran ningún grado de agregación a ninguna concentración. La insensibilidad a epinefrina es compartida por diversas especies de mamíferos (Bondy y Gentry 1989).

Esta aparente insensibilidad de la plaqueta bovina puede estar relacionada con sus diferencias ultraestructurales respecto a las demás especies. Su carencia de sistema canalicular abierto sugiere que su modo de secreción del contenido de los gránulos durante la agregación sea diferente. Posiblemente la postulada necesidad de formar nuevos canalículos tras la activación pueda ser la responsable de este fenómeno (Bondy y Gentry 1989).

### ***2.1.3 El tapón hemostático secundario***

**La Hemostasia secundaria o Coagulación de la sangre** consiste en el refuerzo y estabilización del tapón hemostático primario mediante la incorporación de un entramado de fibrina polimerizada en la cual quedan atrapados plaquetas y glóbulos sanguíneos. Este coágulo es insoluble e irreversible. La coagulación sanguínea culmina con la formación del tapón hemostático secundario o trombo sanguíneo, capaz de controlar hemorragias debidas a lesiones más acentuadas, soportando además la fuerza de reperfusión sanguínea a medida que disminuye la vasoconstricción en el área lesionada. Esta segunda fase de la hemostasia se fundamenta principalmente en el fenómeno de la coagulación sanguínea.

El mecanismo de la coagulación implica una serie compleja de reacciones en las que enzimas inactivas se activan y las activadas a su vez activan a otras que están inactivadas. En ello juegan un papel fundamental las plaquetas y los factores de

coagulación<sup>i</sup>, los cuales activan esta cascada de reacciones que culmina con la producción de fibrina, mediada por la trombina, la cual envuelve y estabiliza el tapón hemostático primario. El tapón hemostático primario reforzado con fibrina recibe el nombre de tapón hemostático secundario o trombo sanguíneo. A pesar de que se denominen como primario y secundario, la formación de este tapón empieza prácticamente al mismo tiempo que la agregación plaquetaria temporal (Robbins 1974).

Las plaquetas no sólo forman el tapón hemostático temporal, también juegan un papel fundamental en la formación del coágulo. Tras la activación de las plaquetas, algunos fosfolípidos cargados negativamente migran hacia la superficie exterior de la membrana celular de la plaqueta, mientras que la fosfatidilcolina migra a la parte interior. Los fosfolípidos expuestos forman el antiguamente llamado factor plaquetar 3 (fosfatidil serina: FP3) y actúan como lugares de unión para las proteínas de la coagulación y son necesarios para la formación de trombina. En la superficie de la plaqueta se forman numerosos complejos que facilitan la formación de algunos factores de la coagulación (IXa, Xa) y de trombina. Las plaquetas también llevan proteína S, que acelera la conversión de la proteína C en proteína C activada (aPC) por medio del complejo trombina-trombomodulina y puede servir para limitar el crecimiento del coágulo (Hathaway 1993a).

Se han descubierto más de 30 sustancias diferentes que afectan a la coagulación de la sangre, presentes en ella y en tejidos; unas estimulando la coagulación (procoagulantes) y otras inhibiéndola (anticoagulantes). Entre ambos grupos de sustancias se establece un equilibrio del cual depende que la sangre coagule o no. La mayoría de estos factores se forman en los hepatocitos, a excepción del factor VIII y del FvW, y circulan como zimógenos inactivos, a excepción del factor VII, que tiene cierta actividad enzimática en su estado basal. Los factores II, VII, IX y X son dependientes de la vitamina K para su

---

<sup>i</sup> Convencionalmente, estos factores se denominan con números romanos y la adición de una "a" indica que están activados.

activación, que es necesaria para que se unan a los receptores de calcio (Angelos y Hamilton 1986, Couto 1999). Los factores XII, XI, X, IX, VII y trombina tienen al aminoácido serina en su sitio activo, y por ende son conocidos como *proteasas serina*. El factor V y el factor VIII:C forman complejos con el calcio y FP3, y actúan como cofactores en la ampliación de la actividad de la cascada de coagulación (Green 1997). La interacción de los factores de coagulación para producir el coágulo se denomina “cascada de la coagulación”, en la cual un factor desencadenante inicia la primera etapa y después viene la conversión seriada de otros factores.

Los factores procoagulantes son las proteasas serina y sus cofactores, que interaccionan normalmente con una superficie de fosfolípidos (membrana de la plaqueta o célula endotelial dañada) para formar un coágulo estable (Tabla 2). Los mecanismos anticoagulantes o inhibidores de la coagulación, limitan y localizan la formación del tapón hemostático en el área lesionada. De no existir estos mecanismos inhibidores, se formaría un trombo cada vez más extenso que acabaría afectando a todo el árbol vascular. La mayoría de estos factores anticoagulantes van dirigidos contra la formación o acción de la trombina, e incluye antitrombinas y el sistema proteína C-proteína S (Tabla 3 de la página 41).

La coagulación sanguínea ocurre en tres etapas principales. En primer lugar se produce la formación de una sustancia denominada activador de la protrombina cuya función es catalizar la conversión de protrombina en trombina. Finalmente, la trombina actúa como enzima para convertir el fibrinógeno en hilos de fibrina, que formarán una trama que atrapa a las plaquetas e incluye también glóbulos rojos y plasma.

**Tabla 2. Factores Hemostáticos procoagulantes**

Nombre	Características
<b>Factores de contacto</b>	
XII (Hageman factor, Glass contact factor)	Proteasa serina
HMWK (High Molecular Weight kininogen, Fitzgerald factor)	Cofactor. Forma complejos con Precalicroína y FXI
Precalicroína (Fletcher factor)	Proteasa serina. Forma complejos con HMWK
XI (Antecedente de la tromboplastina plasmática, PTA)	Proteasa serina. Forma complejos con HMWK
II (Protrombina)	Proteasa serina. Dependiente de la vitamina K.
VII (proconvertina, Factor estable)	Glicoproteína VIIa activa X y IX
IX (Componente de la tromboplastina plasmática, PTC, Factor Antihemofílico B, Christmas factor)	Glicoproteína
X (Stuart-Prower factor)	Glicoproteína proteasa serina
<b>Otros</b>	
I (Fibrinógeno)	Glicoproteína. Mediador de la adhesión plaquetaria.
IV (Calcio)	Cofactor
V (proacelerina, Factor lábil)	Cofactor monoenzimático activado por la trombina
VI No asignado	
III Factor tisular (TF) Tromboplastina tisular	Glicoproteína asociada a fosfolípidos
VIII:C (AHF: Factor antihemofílico A)	Forma complejos con el FvW en plasma
VIII:RAG Factor de von Willebrand (FvW)	Glicoproteína. Mediador de la adhesión plaquetaria.
XIII (Factor estabilizador de la fibrina, Laki-lorand factor)	Zimógeno para transamidasa
Factor de Activación Plaquetar (PAF)	Se produce en muchas células. Activa las plaquetas y células polimorfonucleares. Causa incremento de la permeabilidad vascular e hipotensión.

Refs: Troy 1988, Hathaway y Goodnight 1993a, Angelos y Hamilton 1986



**Tabla 3. Factores Hemostáticos Anticoagulantes o inhibidores**

Nombre	Características
Inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI)	Inhíbe la actividad catalítica de VIIa/TF
Proteína C	Proteasa serina, dependiente de la vitamina K inhibe FVa y VIIIa
Proteína S	Cofactor para la proteína C activada, dependiente de la vitamina K
Trombomodulina	Receptor de superficie de la célula endotelial para trombina
Antitrombina III (cofactor I de la heparina )	Glicoproteína. Forma complejos (1:1) con trombina, Xa, IXa, XIa y XIIa
Cofactor II de la heparina	Forma complejos covalentes (1:1 molar) con heparina. Inhibe trombina
Inhibidor de la esterasa C1	Inhibidor de la calicreína, plasmina, C1 y XIIa y XIa
Inhibidor de la proteína C	Forma complejos con Prot C activada. Acelerada por la heparina.
Antitripsina- <sub>1</sub>	Inhibe la tripsina plasmática, quimiotripsina, FXIa y proteasas tisulares, trombina, calicreína
Macroglobulina- <sub>2</sub>	Proteína dimérica, inhibe plasmina, calicreína y trombina
Fibronectina	Matriz adhesiva de glicoproteína. Mediador de la reparación tisular
Vitronectina	Glicoproteína adhesiva. Se une a heparina, PAI-1 y aumenta T1/2
Trombospondina	Glicoproteína adhesiva. Presente en muchas células y en los gránulos de las plaquetas. Reactivo de fase aguda. T1/2=9 h
Tromboglobulina-	Sintetizada por la rotura del factor de plaqueta 4. T1/2=100min
Factor de Plaqueta 4	Proteína catiónica. Neutraliza heparina. Inhibe la colagenasa. T1/2=20 min

Ref. Troy 1988, Hathaway y Goodnight 1993a

Hay dos maneras básicas, generalmente aceptadas, de iniciar la formación de activador de la protrombina: las denominadas vías Extrínseca e Intrínseca. Ambas vías se activan de forma independiente y confluyen en una vía común, si bien están tan interrelacionadas que hay quien considera que constituyen una única vía de formación de la fibrina (Couto 1999).

- **Por la vía extrínseca.** Empieza con un traumatismo a los tejidos fuera de los vasos. La lesión vascular inicial expone el colágeno subendotelial y el factor tisular que se encuentra en la mayoría de células no endoteliales (Couto 1999) y forma un complejo con el factor VII, dependiente del calcio. La síntesis de factor tisular puede ser inducida por la presencia de interleukina 1, TNF, insulina, interferón, endotoxinas, virus, trombina, complejos inmunes o por la presencia de moléculas de adhesión celular (Ruiz de Gopegui y Navarro 2000). El complejo Factor tisular-VIIa convierte el factor IX en IXa y el factor X en Xa. La activación de la vía extrínseca omite varias de las fases que sí ocurren en la vía intrínseca, por lo que la formación de la trombina y fibrina ocurre mucho más rápidamente (Angelos y Hamilton 1986).
- **Por la vía intrínseca.** Empieza en la propia sangre, mediante la activación del factor de contacto XII en factor XIIa por el estímulo del contacto con el colágeno subendotelial (in vivo) o con alguna otra superficie irregular o con carga eléctrica negativa, como el vidrio (in vitro). Este factor XIIa posibilitará la activación posterior de los factores XI, IX, VIII y eventualmente el X, donde confluye con la vía extrínseca (**Figura 8**).

En realidad, la coagulación de la sangre comienza por ambas vías después de romperse los vasos sanguíneos. Ambas vías se unen en un mecanismo común, en el punto de activación del factor X. Este, se une al factor Va (activado por la trombina), el cual, junto con calcio y protrombinasa forman el complejo que conduce a su vez a la

activación de la protrombina y su transformación en trombina (Hathaway y Goodnight 1993a). La protrombina es una proteína que se forma continuamente a nivel hepático. Esta formación es dependiente de la vitamina K. El ritmo de formación de la protrombina en trombina es casi directamente proporcional a la cantidad de activador de la protrombina disponible, la cual, a su vez, es proporcional al grado de traumatismo sufrido por la pared del vaso o por la sangre. La trombina cumple un papel central en la estimulación de las reacciones plaquetarias de agregación y de coagulación, y por ende su concentración debe ser controlada para prevenir una respuesta hemostática inadecuada. En bajas concentraciones la trombina incrementa su propia producción pero en niveles más altos la disminuye. Esta función reguladora es muy importante para impedir la trombosis (Green 1997).

La trombina, a su vez, activa el paso de fibrinógeno a fibrina, responsable de la formación y estabilización del coágulo. El fibrinógeno es una proteína de alto peso molecular (340.000) que, en su mayor parte, se produce en el hígado. El monómero de fibrina soluble generado por la cascada de la coagulación interactúa con el FvW para facilitar una mayor incorporación de trombocitos dentro del tapón en crecimiento. Ahora, el coágulo está formado por una malla entrelazada de hilos de fibrina polimerizada dispuestos en todas las direcciones que aprisionan dentro de ella glóbulos sanguíneos y plaquetas. La formación de fibrina no sólo depende de la activación de los factores de coagulación, sino también de su fijación a receptores específicos de los trombocitos ya incorporados al tapón hemostático (Green 1997).

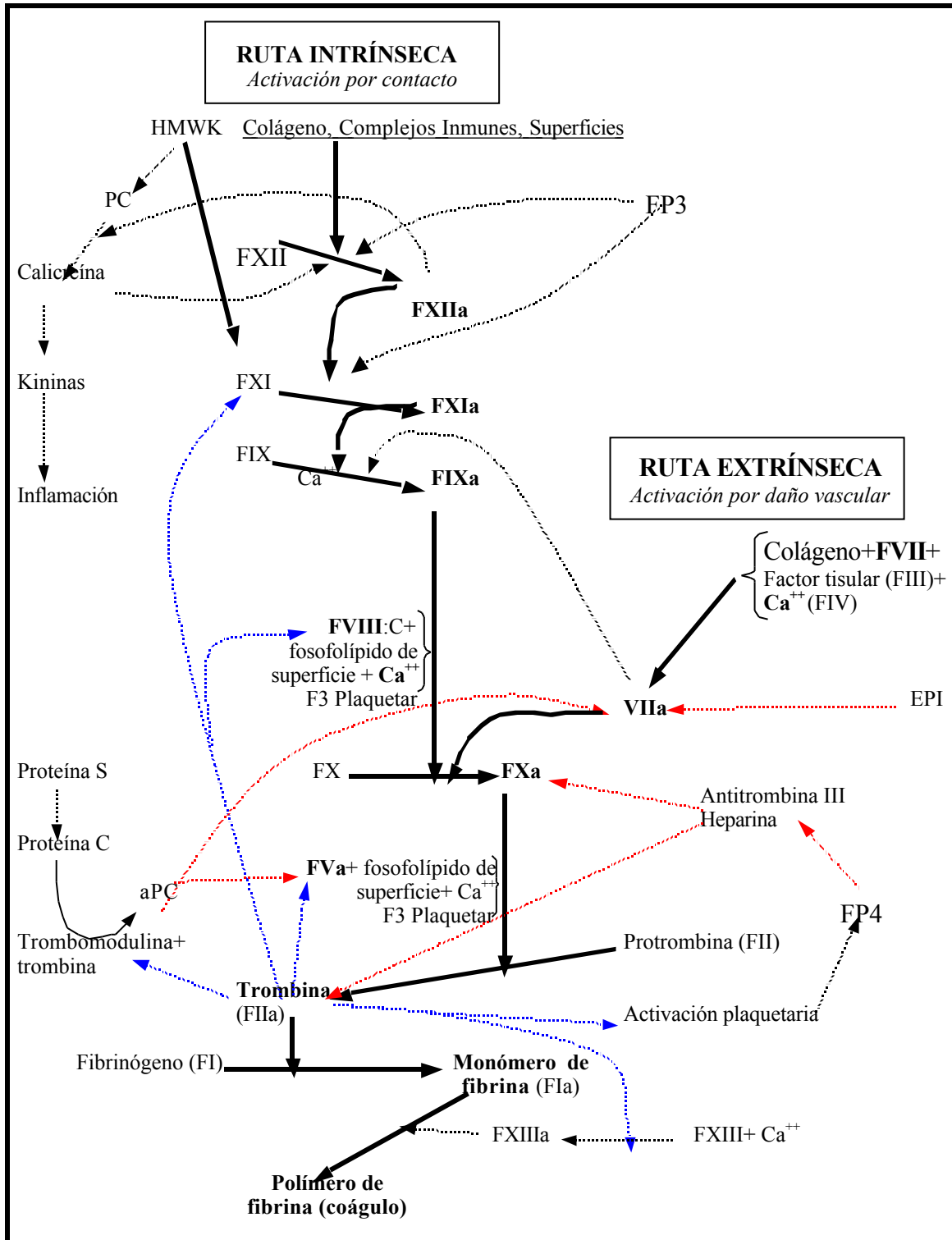
Las dos primeras etapas de la ruta intrínseca se desarrollan lentamente, de manera que un riego sanguíneo enérgico puede impedir la producción de una concentración suficiente de factor XIa para convertir el factor IX. De esta manera puede inhibirse la coagulación progresiva. Sin embargo, una vez que el factor IX sufre conversión, la serie es autocatalítica y prácticamente explosiva. Tan sólo 15 ml de sangre, si se activan bien, contiene suficiente protrombina para precipitar completamente el fibrinógeno de 2500

ml de sangre en tan sólo 15 segundos (Robbins 1974). Los iones de calcio son determinantes en el desencadenamiento de estas reacciones, por ello, los quelantes del calcio son anticoagulantes.

Una vez iniciada la coagulación de la sangre, normalmente en unos minutos se extiende a toda la sangre vecina. Una de las causas más importantes de ello es la acción proteolítica de la trombina ya que le permite actuar sobre varios de los demás factores de la coagulación. Afortunadamente, esto sólo ocurre si la sangre no circula porque, si existe una circulación sanguínea normal, el flujo se lleva la trombina y otros procoagulantes alejándolos tan rápidamente que no puede aumentar con rapidez suficiente para fomentar una mayor coagulación.

El fracaso del refuerzo del tapón de fibrina puede llevar al resangrado de las heridas tiempo después del cese de la hemorragia inicial. El resangrado aparece en pacientes con mala formación del tapón hemostático debida a deficiencias hereditarias en los factores de coagulación (Green 1997).

Figura 8. Esquema del mecanismo general de la Coagulación de la sangre y de la modulación hemostática.



Refs: Troy 1988, Hathaway y Goodnight 1993a, Green 1997, Angelos y Hamilton 1986

#### ***2.1.4 La Fibrinólisis***

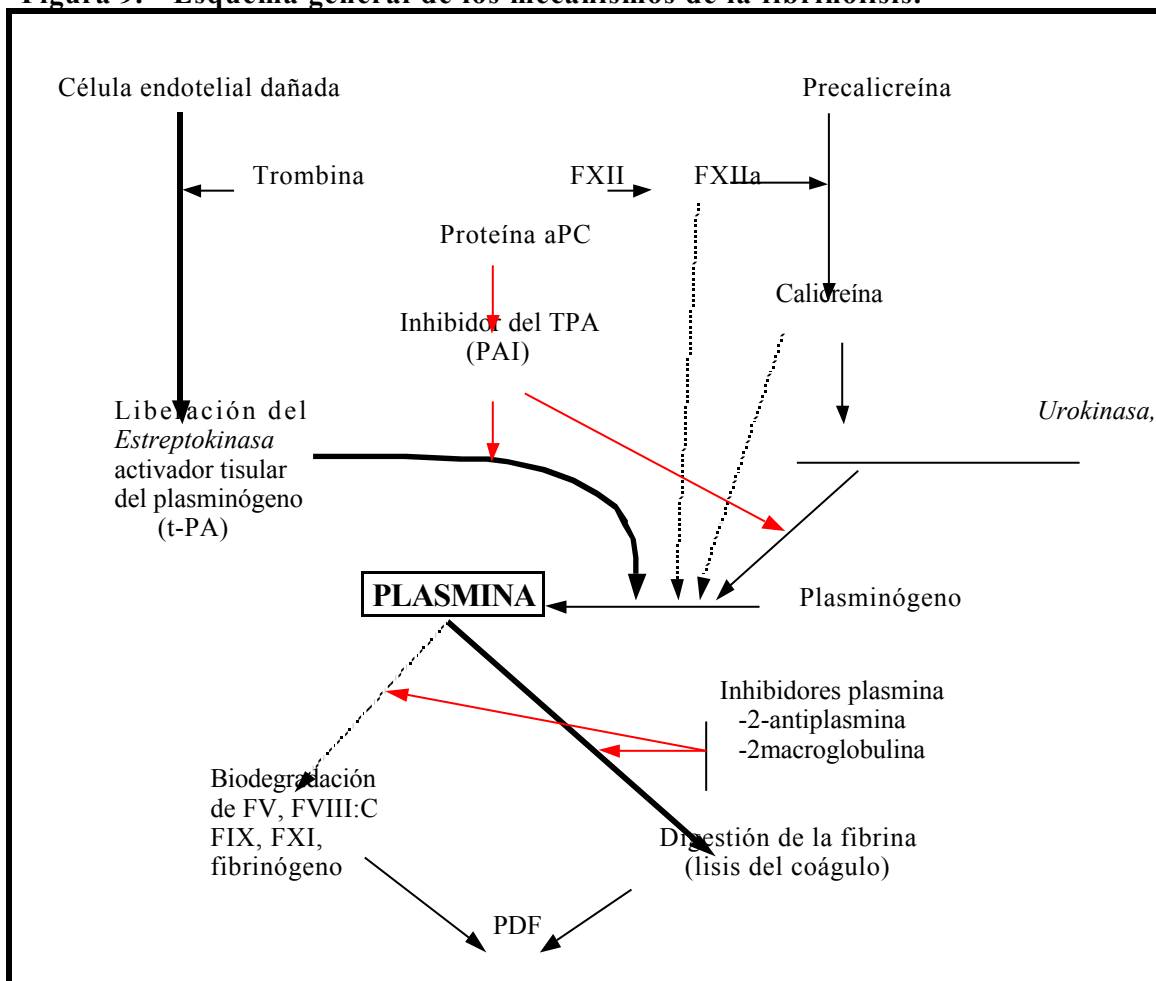
La tercera de las fases de la hemostasia se basa en la actuación del sistema fibrinolítico. El sistema fibrinolítico es activado al mismo tiempo que la cascada de la coagulación y promueve la disolución gradual del coágulo sanguíneo mediante la lisis de los polímeros de fibrina. La fibrinólisis tiene lugar mediante la transformación de una sustancia presente en el interior del coágulo de fibrina, el plasminógeno, en una enzima proteolítica, la plasmina. La plasmina actúa hidrolizando los polímeros de fibrina, pero también tiene la capacidad de hidrolizar fibrinógeno, FV y FVIII (Angelos y Hamilton 1986). La generación de dicha enzima está regulada por un sistema complejo de activadores e inhibidores que controlan su acción fibrinolítica, de modo que exista un equilibrio entre la formación del coágulo y su degradación evitando, de este modo, la aparición de trombos en el interior de los vasos.

El plasminógeno tiene gran afinidad por la fibrina, y se incorpora dentro del tapón hemostático a medida que esta se genera. A su vez, las células endoteliales dañadas liberan un activador tisular del plasminógeno (t-PA) que tiene una alta afinidad para unirse con él y favorecer la formación de plasmina. La acción de la plasmina sobre el fibrinógeno y la fibrina tiene como consecuencia la formación de una variedad de Productos de Degradación de la Fibrinólisis (PDFs) cuya detección es de gran ayuda en el diagnóstico de diversos estados patológicos relacionados con la hemostasia (Couto 1999, Green 1997).

**Tabla 4. Factores de la fibrinólisis**

Nombre	Características
Plasminógeno	Glicoproteína
Activador tisular del plasminógeno (t-PA)	Proteasa serina
Antiplasmina- <sub>2</sub>	Glicoproteína serpina. Inhibidor específico de la plasmina (1:1)
Inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1)	Glicoproteína serpina. Forma complejos con t-PA y uPA
Inhibidor del activador de plasminógeno-2 (PAI-2)	Glicoproteína serpina. Forma complejos con t-PA y uPA. Se encuentran sólo trazas en el plasma.

**Figura 9. Esquema general de los mecanismos de la fibrinólisis.**



Refs: Green 1997, Hathaway y Goodnight 1993a

## **2.2 Métodos de valoración de la hemostasia**

Existen muchas pruebas utilizadas para valorar el estado del sistema hemostático de un paciente y determinar la funcionalidad de las diversas fases de la hemostasia. Algunas de las que se han utilizado durante años y que han sido útiles para tener una medida aproximada de la funcionalidad del sistema hoy en día pueden considerarse obsoletas, como el tiempo de coagulación (Litter 1986), test de retracción del coágulo (Hackner 1995), solubilidad del coágulo en urea (Angelos y Hamilton 1986), mezcla de plasma del paciente con plasma normal (Hackner 1995, Green 1997), etc. Otras pruebas igualmente clásicas, en cambio, se han ido mejorando y se han finalmente consolidado como pruebas útiles para definir la situación hemostática de un paciente y se utilizan actualmente tanto en medicina humana como veterinaria. Finalmente, cada día surgen nuevas técnicas que permiten la determinación de factores muy específicos dentro del fenómeno de la hemostasia, principalmente mediante técnicas inmunológicas, si bien su uso ha sido muy poco desarrollado en los animales domésticos y generalmente tan sólo a nivel de investigación.

Todas estas pruebas tienen en común una cierta metodología en la toma, conservación y procesado de las muestras de sangre, de manera que, si no se siguen unas ciertas pautas los resultados de los tests que se realicen pueden quedar completamente desvirtuados (Hathaway y Goodnight 1993b). Así, por ejemplo, el paciente no debe estar sobreexcitado, puesto que se ha descrito que una mínima excitación puede hacer aumentar la cantidad de plaquetas circulantes, la agregación de los trombocitos así como de varios factores de la coagulación. Asimismo, las muestras nunca deben recolectarse mediante catéteres que hayan sido empleados para administrar heparina. También deben evitarse los catéteres excesivamente largos, puesto que la extracción de sangre mediante cualquier tipo de catéter largo puede activar los componentes hemostáticos debido a las interacciones sangre-superficie. La superficie de cualquier recipiente de recolección o transferencia debe ser uniforme, en particular para los estudios de función plaquetaria. Incluso los envases de vidrio podrían también activar la



cascada intrínseca y alterar los resultados (Green 1997).

El anticoagulante más usado para la conservación de las muestras es el citrato sódico al 3,8%, debido a su superior preservación de los componentes hemostáticos. La proporción anticoagulante:sangre es 1:9 para la mayoría de las técnicas, de manera que cualquier desvío de la proporción adecuada podría falsear los resultados. Debido a estas peculiaridades y para evitar errores de interpretación debidos a un mal transporte, procesado o conservación de la muestra o de los reactivos, en todas las determinaciones debe incluirse plasma control de animales sanos (Green 1997).

En muchas ocasiones, las investigaciones realizadas con factores de la coagulación en animales domésticos se han realizado utilizando reactivos o estándares preparados por los propios investigadores, por lo que son poco útiles para comparaciones interlaboratorios al no existir unos valores de referencia perfectamente claros. Ello hace que la interpretación de los resultados de los trabajos publicados sobre la hemostasia en animales deban ser interpretados con precaución (Karges y cols. 1994).

### ***2.2.1 Parámetros de valoración de la hemostasia primaria***

Existen diversos tests para la valoración del estado de las plaquetas y de su interacción con las células endoteliales. Las plaquetas pueden enumerarse mediante recuentos al microscopio, en el cual puede también estudiarse su morfología. Asimismo, la rapidez y el grado de agregación plaquetar frente a diversos agonistas puede estudiarse mediante agregómetros. Otros test mucho más específicos y sofisticados se refieren a la medición de receptores plaquetares específicos o de sus ligandos (GPIb, vWF, etc). A nivel práctico, el Tiempo de Sangría (TS) es el que más se utiliza en la práctica clínica como medida de la formación del tapón hemostático primario, reflejando tanto el número como la funcionalidad plaquetar del paciente (Hathaway y Goodnight 1993b).

### ***2.2.1.1 Recuento de Plaquetas***

El recuento de plaquetas, en tanto que son los elementos principales de la hemostasia, es un test esencial para poder realizar cualquier estudio relacionado con el sistema hemostático. Cualquier alteración significativa del número de plaquetas, principalmente su disminución, puede ser la causa de la alteración de los resultados de otros tests que se utilizan normalmente para la valoración del sistema hemostático y, principalmente, los del TS.

Desde el punto de vista clínico un animal con un recuento bajo de plaquetas (trombocitopenia) puede mostrar una tendencia a la hemorragia o incluso hemorragias espontáneas. De hecho, la trombocitopenia es la causa más frecuente de hemorragia espontánea en los animales, particularmente en perros y también en caballos (Couto 1999). La trombocitopenia puede deberse a un descenso en la producción de plaquetas, aumento de su consumo o a ambas cosas.

- El descenso en su producción se debe a alteraciones de la médula ósea, que pueden ser consecuencia de toxinas (tricloroetileno, “brakenfern” en bóvidos), infecciones (Erlichiosis, Ricketsiosis, Parvovirus, Retrovirus, Diarrea Vírica Bovina (BVD), Tripanosomiasis, Peste Porcina Africana), fenómenos inmunes, aplasia medular idiopática o debida a fármacos (estrógenos, fenilbutazona, antibióticos beta-lactámicos, cloranfenicol, sulfamidas, etc). Generalmente el descenso de la producción plaquetar va asociado a una supresión general de la hematopoyesis (Ej. anemia aplástica) (Weiss 2000, Couto 1999).
  
- Más común es el aumento en la degradación de las plaquetas, que puede deberse a mecanismos inmunológicos (incluidas vacunaciones), neoplasias, endotoxemia e infecciones (Erlichiosis, Leptospirosis, Babesiosis). También puede ocurrir por un

aumento en la utilización de las plaquetas en casos de estados de hipercoagulabilidad, Coagulación Intravascular Diseminada (CID), hemorragias, secuestro por esplenomegalia y hepatomegalia (Couto 1999).

Esta variada casuística refuerza, si cabe, la importancia de la realización de un recuento de plaquetas en cualquier investigación sobre la coagulación, que podría verse claramente alterada en caso de anomalías en el número de plaquetas presentes.

En el hombre, al igual que en perros, la concentración fisiológica de plaquetas en sangre es de 150.000 a 450.000 por  $\mu\text{l}$  (Hathaway y Goodnight 1993c, Couto 1999). Parecidos valores se han descrito también en caballos (100.000-250.000/ $\mu\text{l}$  según Monreal y cols. 1995a, Monreal y cols. 1995b, Monreal y cols. 2000) y algo superiores en conejos (477.500-625.000/ $\mu\text{l}$  según Monreal y cols. 1993). En bóvidos se han descrito rangos de 450.000 a 714.000 plaquetas por  $\mu\text{l}$  (Bastos da Silva 1998). Aunque hay animales o razas que frecuentemente tienen menos, no se producen hemorragias espontáneas típicas de trastornos de la coagulación primaria (petequias, equimosis, etc.) hasta que su número desciende por debajo de 25.000/ $\mu\text{l}$  (Couto 1999). Si la pérdida de sangre es importante (epistaxis, melena, hematuria, etc.) puede presentarse conjuntamente con un cuadro de anemia.

La técnica en sí consiste simplemente en el recuento de las plaquetas existentes en un frotis de sangre. La observación detenida del frotis de sangre sigue siendo hoy en día de gran importancia a pesar de existir contadores electrónicos, puesto que el recuento mediante un contador electrónico puede verse alterado en caso de pseudotrombocitopenia, aglutinación plaquetar, microsferocitos, eritrocitos o leucocitos fragmentados o por la presencia de bacterias (Bascuas y Climent 1983, Hathaway y Goodnight 1993c), mientras que el estudio de un frotis de sangre permite llevar a cabo simultáneamente el estudio morfológico de las plaquetas (Angelos y Hamilton 1986). En

contadores electrónicos, sin embargo, suele también determinarse el Volumen Medio de las Plaquetas (MPV) o el Tamaño medio de las plaquetas. El MPV, en el hombre, se sitúa generalmente entre 6 y 10 fL (Hathaway y Goodnight 1993c), si bien en bóvidos es ligeramente menor (Bastos da Silva 1998).

### ***2.2.1.2 Tiempo de Sangría***

Este test es de gran importancia para la monitorización del funcionamiento de la hemostasia primaria. De hecho, este es el único test capaz de evaluar la interacción vaso-plaqueta en esta fase de la hemostasia, de manera que cualquier disfunción plaquetar inducida por cualquier mecanismo puede resultar en un alargamiento del TS (Schemerhorn y cols. 1994). Tal como se verá más adelante, este test se ha utilizado por numerosos autores para demostrar la eficacia de diversos fármacos reguladores de la hemostasia primaria tanto en animales como en el hombre (Litter 1986).

En sí, el TS se define como el tiempo necesario para que cese la hemorragia tras la realización de una incisión superficial estandarizada. El hecho de utilizar unas cuchillas de dimensiones bien definidas y que, por tanto, producen una hemorragia más o menos constante, permite que a pesar de ser una prueba in vivo, con la variabilidad que eso supone, se obtengan unos resultados cuantificables y repetibles. A partir de este principio se han descrito numerosas variantes y métodos de realización utilizando una o dos cuchillas (método de Mielke o template) o tres cuchillas y un esfigomanómetro para estandarizar la presión venosa en la zona (método de Ivy) (Litter 1986, Angelos y Hamilton 1986).

El TS es una medida de la eficiencia de las fases vascular y plaquetar de la hemostasia, evaluando la interacción entre las plaquetas y el endotelio (o subendotelio), que causa la formación del tapón hemostático primario (Couto 1999). Normalmente se utiliza para detectar alteraciones en la funcionalidad de las plaquetas siendo independiente de

posibles deficiencias en los factores de coagulación, a no ser que sean realmente severas (Angelos y Hamilton 1986). Obviamente, si el número de plaquetas está reducido el TS se alargará, a pesar que su funcionalidad pueda ser correcta, por ello es esencial para su correcta interpretación realizar el contaje de plaquetas previamente al TS.

La técnica en sí, a pesar de que como ya se ha dicho, está muy estandarizada, depende en gran medida de la pericia de la persona que lo realice. Utilizando los dispositivos actualmente disponibles se consigue una herida estandarizada de 5-6 mm de largo x 1 mm de profundidad siendo realizada normalmente, en el hombre, en el antebrazo a 5 cm de la fosa anticubital o en el lóbulo auricular según el método de Duke (Litter 1986, Hathaway y Goodnight 1993c). En todos los métodos se recoge la sangre que sale por la incisión a intervalos de 30 segundos absorbiéndola en un papel de filtro hasta que deja de sangrar. El tiempo que tarda hasta que cesa completamente la hemorragia es el TS. En todos los casos es muy importante retirar la sangre con cuidado a intervalos regulares para evitar en todo momento la formación de un coágulo que podría ocluir la salida de sangre y acortar el TS. Por otra parte si se roza la herida con el papel demasiado bruscamente, se puede romper el frágil tapón plaquetar y alargarse el TS (Angelos y Hamilton 1986). Esto hace que la determinación del TS lleve implícita una importante variabilidad en función de la persona que lo realiza, método empleado, zona anatómica utilizada, profundidad del corte, instrumento utilizado, etc. siendo habitual una cierta variabilidad, incluso en el mismo paciente, que puede ser de 2 a 3 minutos en el hombre (Angelos y Hamilton 1986, Nolte y cols. 1997).

Debido al diferente grosor de la piel de las diversas especies animales, la realización del TS utilizando la misma técnica y utensilios que en el caso del hombre no siempre ha dado resultados satisfactorios (Jergens y cols. 1987), por lo que se han desarrollado una serie de técnicas alternativas basadas principalmente en la localización de zonas anatómicas adecuadas a la especie en cuestión y algunas variantes al procedimiento general arriba descrito:

- En el perro se ha descrito en el labio superior (BMBT: Buccal Mucosa Bleeding Time) (Couto 1999) o el menos fiable “Cuticle bleeding time”, consistente en medir el tiempo hasta que cesa la hemorragia tras cortar la punta de la dermis de las uñas en el perro (en esta modalidad el tiempo de sangrado se ve aumentado tanto en defectos de la hemostasia primaria como secundaria). Se suele utilizar un esfingomanómetro ubicado en la parte más proximal de la extremidad, ajustado a 40 mm Hg de presión para provocar una estasis sanguínea y uniformizar las condiciones de aplicación del test. En el BMBT se utiliza un torniquete alrededor de la mucosa bucal con la misma función (Couto 1999, Schemerhorn y cols. 1994). De no utilizarse el esfingomanómetro se pierde sensibilidad para detectar la enfermedad de von Willebrand (vW) (Angelos y Hamilton 1986). También se ha utilizado el CBT (Capillary Bleeding Time) en el lateral de un dedo de la pata delantera, con la ventaja de no precisar anestesia, a diferencia del BMBT, si bien precisa de la aplicación local de un hiperhemiante (Nolte y cols. 1997).
  
- En el caballo también se utiliza el esfingomanómetro aplicado en la parte proximal del carpo para realizar el TS en la zona caudomedial de la extremidad anterior algo distal de la articulación del carpo. Esta zona se caracteriza por carecer de vasos sanguíneos superficiales que pudieran dificultar la realización del test. Según esta técnica se obtienen TS de alrededor de 7,8 minutos de media (rango de 2,5 a 14 minutos) en la especie equina (Kopp y cols. 1985, Monreal y cols. 1995b).
  
- En el conejo se ha utilizado el método de Roskam, el cual, basándose en patrón de vascularización del pabellón auricular del conejo, permite comparar los valores del TS realizado en ambas orejas en diversas incisiones en varias zonas anatómicas de cada oreja de cada animal, con lo que se consigue disminuir en buena medida la variabilidad del método (Laporte 1961). También se ha utilizado el método de Duke modificado para realizarse en el interior del pabellón auricular de esta especie (Monreal y cols.1993).

- En cerdos también se ha descrito el “Ear immersion bleeding time”, en el cual se practica una incisión en el margen de la oreja y esta se sumerge en un recipiente con solución salina citratada a 37°C. Si el sangrado persiste por más de 30 minutos se considera excesivo y sintomático de enfermedad de vW mientras que valores de 5-12 minutos se encontrarían en un rango de normalidad (Roussi y cols. 1998). En esta especie también se ha descrito la determinación del TS por el método de Mileke en la parte interior del pabellón auricular (Dickneite y cols. 1998).
- En bóvidos se ha descrito su realización en terneros en la parte rostral del rodete dental, considerándose normales valores inferiores a los 5 minutos (Sullivan y cols. 1994).
- En algunas especies animales es necesaria la tranquilización previa de los animales para poder realizar el test con alguna precisión. En perro se suelen utilizar procedimientos mecánicos, y en gato se suele administrar 15-20 mg/kg de ketamina HCl y 0,2 mg/kg de acepromacina maleato IM (Couto 1999).

Además de con el método utilizado, el TS varía notablemente en las diversas especies animales, tal como puede comprobarse en la **Tabla 5**.

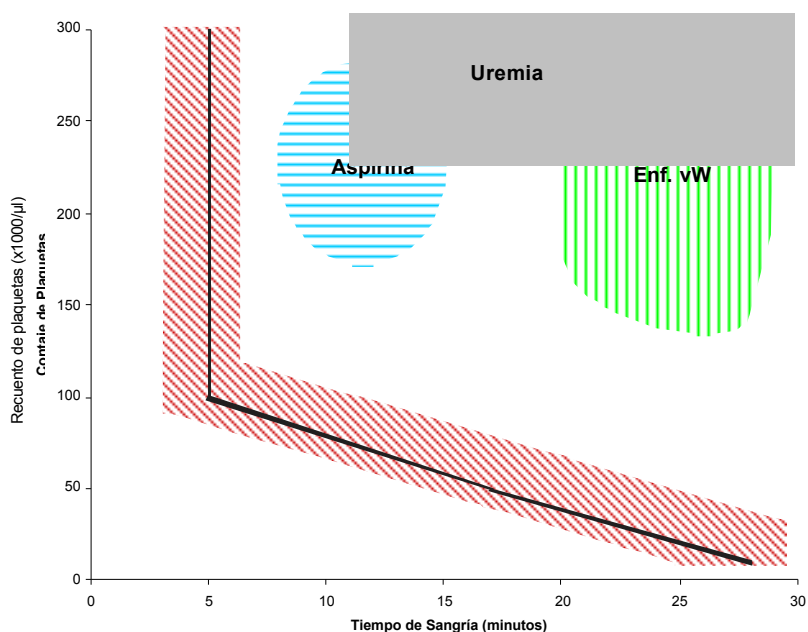
**Tabla 5. Tiempo de sangría en diferentes especies**

Espece	Método	Tiempo de Sangría
Hombre	Duke	1-3,5 min
	Ivy	2-7 min
Perro	Mielke (template)	2,5-7,5 –9 min
	BMBT	37s-2,5 min
Perro-Gato	Cuticle Bleeding Time	2-8 min
Gato	Torniquete	1,4-3 min
Cerdo	Mielke (template)	1,3-2,8 min
Ternero	Rodete dental	<5 min
Caballo	Mielke (template)	2,5-14 min
Conejo	Roskam	3,7-4,8 min
	Duke	52-91 s

Ref. Angelos y Hamilton 1986, Monreal y cols 1993, Couto 1999, Dickneite y cols. 1998, Kopp y cols. 1985, Laporte y Esteve 1967, Cornet 1969, Schemerhorn y cols. 1994, Sullivan y cols. 1994, Monreal y cols. 1995b, Grubbs y Olchowoy 1997.

El TS está influenciado por diversos factores. En humanos se ha descrito que es más corto en recién nacidos que en adultos, con tendencia a ser más largo en mujeres y decreciendo con la edad (Cornet 1969). Los hábitos alimentarios, como el aceite de pescado pueden alargarlo (Hathaway y Goodnight 1993c).

Figura 10. Relación entre el TS y el recuento de plaquetas según Hathaway y Goodnight (1993c)



El alargamiento del TS se debe generalmente a defectos de las plaquetas, que pueden ser cuantitativos o cualitativos:

- En el caso de **trombocitopenia** el TS se alarga de forma lineal cuando el recuento de plaquetas desciende hasta 100.000-10.000 por  $\mu\text{l}$  (Figura 10). El TS también puede aumentar debido a alteraciones mieloproliferativas, en las que el recuento de plaquetas es de un millón o superior, sin embargo, pequeños aumentos en el recuento de plaquetas no se traducen en modificación del TS (Angelos y Hamilton 1986). El



TS es inversamente proporcional al recuento de plaquetas (siempre que sea inferior a 100.000/ $\mu$ l), masa de plaquetas y hematocrito (en general la anemia prolonga y la eritrocitosis disminuye el TS) (Hathaway y Goodnight 1993c). Asimismo, el TS está relacionado con los niveles de FvW plaquetar más que con FvW plasmático (Kallis y cols. 1994).

➤ En el caso de **alteraciones del TS con un adecuado contaje de plaquetas**, debe existir algún defecto en la fisiología de las mismas o de su interacción con los vasos que puede ser adquirido o genético:

➤ **De los pocos defectos plaquetares de origen genético** el más común y que ha sido descrito en bóvidos y otras especies animales es la enfermedad de vW (Sullivan y cols. 1994), aunque también se ha descrito la existencia del síndrome de Chédiak-Higasi en bóvidos y otras especies animales incluido el hombre (Meyers y cols. 1982). En humanos se describen también los síndromes de Bernard-Soulier (deficiencia de GPIb/IX) o la trombastenia de Glanzmann (deficiencia de GPIIb/IIIa) (Angelos y Hamilton 1986), esta última también ha sido descrita en perros (Goldston y cols. 1982). Sin embargo, existen otros muchos defectos de la función plaquetar de origen hereditario, bien relacionados con alteraciones en la acumulación de mediadores de la agregación en los gránulos plaquetares o bien defectos de su liberación al medio (Hathaway y Goodnight 1993d). Estos defectos, bien estudiados en humanos, han sido raramente descritos en animales domésticos.

La enfermedad de vW se caracteriza por una baja capacidad de síntesis del factor VIII, necesario para la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular. Menos frecuentemente, la enfermedad puede consistir en la síntesis defectuosa del FVIII o de su deficiente polimerización. El resultado final es, en cualquier caso, un retraso en la adherencia de las plaquetas al subendotelio

de la pared vascular y, por tanto, de la formación del tapón hemostático primario aún manteniendo un recuento y fisiología de plaquetas completamente normal. Se han descrito diferentes variantes que afectan de forma desigual a diferentes razas, fenómeno especialmente descrito en perros (Van Dongen y cols. 2001). El tratamiento de la enfermedad consiste en la administración de FVIII, que corrige el TS durante 4-6 horas (Angelos y Hamilton 1986).

- **Las alteraciones más comunes de la función plaquetar son adquiridas.** En casos de consumo excesivo de factores de coagulación (acquired storage pool deficiency), puede producirse un alargamiento del TS. Algunas enfermedades en que esto puede ocurrir son la leucemia, enfermedades cardíacas (valvulopatías), malformaciones vasculares, interacciones con cuerpos extraños, enfermedades renales, arteriosclerosis o trombosis de pequeños vasos. Otro tipo de alteraciones son debidas a alteraciones en la unión plaqueta-proteína (inmunoglobulinas, complejos antígeno-anticuerpo, productos de degradación de la fibrina), que pueden darse en casos de infecciones víricas o bacterianas. También pueden ocurrir por estados carenciales (vitamina B<sub>12</sub>, E o Zn) o desórdenes de tipo sistémico como uremia (posiblemente por inducir un exceso de producción de PGI<sub>2</sub> a nivel endotelial), alteraciones del glucógeno y en enfermedades hepáticas o renales (Goldston y cols. 1982, Hathaway y Goodnight 1993e). Por otra parte, aunque el TS debería también alargarse en caso de alteraciones vasculares (desórdenes del tejido conectivo), esto raramente ocurre, por lo menos en perros y gatos (Couto 1999).

En el caso de los animales domésticos, lo más frecuente es que la función plaquetar se halle alterada debido a la administración de fármacos, si bien los efectos de la mayoría de estos medicamentos sobre la hemostasia no se han

descrito con detalle más que en humanos (Ruiz de Gopegui y Feldman 1998). Por otra parte, si bien muchas drogas pueden alterar la función plaquetar in vitro, no siempre alteran el TS in vivo (Fenotiacina, Antihistamínicos, Antidepresivos tricíclicos). Finalmente, en el hombre también se han descrito alteraciones adquiridas no relacionadas con fármacos, como la Amiloidosis y la Púrpura senil (Angelos y Hamilton 1986).

Los principales tipos de fármacos que pueden producir alteraciones del TS son los antiinflamatorios, antibióticos y anticoagulantes (Hathaway y Goodnight 1993e):

- Inhibidores del metabolismo del AA (AINEs): *Aspirina, Indometacina, Naproxeno, Fenilbutazona, Ketoprofeno, Ibuprofeno, Diclofenaco, etc.*
- Simuladores de la adenilciclase y guanilciclase: *Óxido Nítrico; Nitroglicerina, Prostaglandinas I<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>.*
- Antagonistas del calcio: *Diltiazem, Nifedipina, Verapamil.*
- Coloides: *Dextranos, Almidones.*
- Inhibidores de la fosfodiesterasa: *Dipiridamol, Metilxantinas.*
- Antibióticos β-lactámicos: *Penicilina G, Ampicilina, Cefalosporinas.*
- Otros: *Moxalactam, Heparina, Etanol, Carbenicilinam, Condroitín sulfato, Estrógenos, Gentamicina, Halotano, Lidocaína, Procaína, Propanolol, Sulfamidas, Ticlopidina, ácido aminocaproico, etc.*

Algunos antibióticos a altas dosis pueden interferir en la agregación plaquetar y aumentar el TS, si bien su efecto cesa al disminuir la dosis. Los dextranos prolongan el TS inhibiendo la función plaquetar posiblemente mediante la alteración de la membrana de las plaquetas. La heparina a dosis elevadas puede también inhibir la interacción de las plaquetas con el colágeno (Angelos y Hamilton 1986).

Los inhibidores de la ciclooxigenasa, AINEs y en particular el ácido salicílico, tienen una gran influencia en el TS. La aspirina alarga el TS durante toda la vida de las plaquetas al unirse irreversiblemente a la ciclooxigenasa plaquetar (5-8 días en el hombre). Sin embargo, parece ser que la plaqueta bovina es insensible a la

acción de la aspirina (Bastos da Silva 1998). La ciclooxigenasa cataliza la formación de endoperóxidos y, por tanto, de TXA<sub>2</sub> a partir del AA. Estos compuestos inducen a la liberación del contenido de los gránulos de las plaquetas, lo que promueve la agregación plaquetar y la vasoconstricción. Otros AINEs, como la fenilbutazona causan el mismo efecto pero tan sólo durante la vida del fármaco en la sangre, puesto que su unión con la ciclooxigenasa es reversible (Angelos y Hamilton 1986).

Como se ha visto, cualquier alteración cualitativa o cuantitativa de las plaquetas o de su interacción con los vasos pasa por un alargamiento del TS respecto a sus valores normales. En caso de un recuento de plaquetas dentro de un rango normal, el TS es el exponente más claro del estado de la hemostasia primaria del paciente. En cualquier caso, los valores considerados normales abarcan un rango considerablemente amplio, que no impide que, aún siendo normal, un TS más prolongado que otro sea indicativo de una mayor tendencia al sangrado y un TS corto a una mayor facilidad de control de la hemorragia capilar. Este fenómeno ha sido utilizado para demostrar la eficacia antihemorrágica de diversos fármacos con acción sobre la hemostasia primaria, entre ellos el etamsilato (Laporte 1961).

Con frecuencia se utiliza el TS como un test de comprobación antes de la intervención quirúrgica en hospitales humanos con la intención de extremar las precauciones en caso de TS alargados para evitar un sangrado excesivo. Sin embargo, aunque se han descrito algunos indicios (Jergens y cols. 1987) esta correlación no ha sido completamente demostrada hasta el momento (Hathaway y Goodnight 1993c), ni siquiera en pacientes que tomaron diversas dosis de aspirina (con un considerable alargamiento del TS), antes de la intervención. En este sentido se ha postulado que el TS de la piel no siempre representa el TS de otras zonas anatómicas y, por otra parte, la variabilidad intrínseca del TS hace que, como test de comprobación, adolezca de unos valores claros para definir cuándo un TS es excesivamente alargado. Sin embargo, este test es muy sensible a

modificaciones de la función plaquetar por cualquier factor, incluidos fármacos (Lind 1991).

Al controlar únicamente la hemostasia primaria, el TS no es indicativo de una mayor o menor propensión a la hemorragia en caso de rotura de grandes vasos en los que además de la agregación y adhesión plaquetar, es precisa la formación de un trombo sanguíneo definitivo por mediación de la hemostasia secundaria. Para la definición del funcionamiento de diferentes aspectos de la hemostasia secundaria se han desarrollado numerosos tests que se mencionan en el apartado 2.2.2.

### ***2.2.1.3 Otros tests de la hemostasia primaria***

Puesto que se trata de una prueba in vivo, de ejecución engorrosa y resultados variables, se ha intentado substituir el TS por pruebas in vitro, como el **tromboelastograma o la trombografía de resonancia**, que en realidad pretenden plasmar todas las fases de la coagulación como una unidad (Otto y cols. 2000, Mischke y Nolte 2000). Sin embargo, se ha comprobado que los resultados no están suficientemente correlacionados. Ello es probablemente debido a que el TS, al perforar la pared vascular y la piel, libera tromboplastina tisular, colágeno, ADP y otras sustancias estimuladoras de las plaquetas en el microambiente de la incisión. Por su parte, el tromboelastograma utiliza sangre obtenida directamente del interior del vaso, midiendo la consistencia del coágulo a lo largo del tiempo (muy dependiente de la retracción plaquetar y de la interacción fibrina-plaqueta) y carece, por tanto, de estos estímulos. Posiblemente si en este mismo test se estimulara a las plaquetas podría obtenerse una sensibilidad suficiente (Trentalange y Walts 1991). Al igual que otros tests globales como el Tiempo de Coagulación Activado (ACT), tanto el tromboelastograma como la trombografía de resonancia carecen de suficiente sensibilidad, siendo más útiles como test de comprobación para defectos de la fibrinólisis (Mischke y Nolte 2000), aunque también

se han descrito diferentes patrones de tromboelastografía característicos de deficiencias de factores concretos, trombocitopenia e hipercoagulabilidad (Otto y cols. 2000).

Para testar la posibilidad de un defecto plaquetar se realiza también, aunque no de forma rutinaria, **el test de agregación plaquetar**, por medio de un agregómetro, tras la adición de diversos agonistas como ADP, AA, ristocetina, epinefrina, trombina o colágeno (Weiss 1975b, Soloviev y cols. 1999, Meyer y Harvey 2000). En un principio se utilizaron técnicas turbidométricas en que se medían variaciones en la densidad óptica del plasma a medida que se producía la agregación plaquetar en una muestra de plasma rico en plaquetas. Posteriormente se desarrollaron tests para sangre entera por medio de sistemas de electrodos midiendo cambios en la impedancia o por técnicas de conteo de plaquetas libres (Whittle 1987). Actualmente esta técnica puede realizarse en sangre entera y en presencia de todos los elementos que la conforman, por lo que es frecuentemente utilizada por los investigadores, y especialmente en el estudio de las acciones de las prostaglandinas y sus derivados en la hemostasia primaria (Whittle 1987, Soloviev y cols. 1999). Según Soloviev y cols. (1999) en este test las plaquetas caninas responden a muchos agonistas, las humanas no responden a la epinefrina y las plaquetas bovinas sólo responden parcialmente a la estimulación con colágeno. La rata y el conejo sufren un alto grado de agregación cuando se estimulan con ADP con o sin la presencia de fibrinógeno. Esta técnica también se ha utilizado para medir el efecto de la aspirina y otros fármacos, a diferentes tiempos, sobre la agregación plaquetar (Litter 1986, Dickneite y cols. 1998).

Otra alternativa es la cuantificación in vitro de la adhesión plaquetar y formación de trombos mediante una cámara de perfusión recubierta interiormente con colágeno por medio del llamado **test de retención plaquetar** o Salzman test, abarcando tanto adhesión como agregación (Jackson 1987, Soloviev y cols. 1999). Al flujo de sangre deseado y tras el fijado y tinción de la cámara se realizan cortes transversales de la misma y, al microscopio, se puede comprobar el porcentaje de la superficie de la cámara

recubierto por plaquetas (% adhesión) y el volumen medio de trombos por área. Este test se ha realizado en cerdos y bóvidos con enfermedad de vW (Roussi y cols. 1998, Sullivan y cols. 1994). Cuando se estudia la adhesión y agregación de las plaquetas al subendotelio vascular en aorta de conejo se utiliza el test de Baumgartner (Soloviev y cols. 1999).

Por otra parte, recientemente se están desarrollando nuevos métodos más sencillos de aplicar para valorar la adhesión y agregación plaquetar simulando in vitro el flujo sanguíneo sobre el endotelio alterado con la presencia de agonistas. Algunos de estos métodos, como el denominado “**Closure time**” o **TS in vitro**, muestran una gran correlación con el TS in vivo en el hombre y podrían permitir en un futuro la determinación de alteraciones de la hemostasia primaria de un modo objetivable también en los animales domésticos (Alshameeri y Mammen 1995, Favalaro 2001, Callan y Giger 2001).

La medición de algunos factores específicos, tal como se describe más adelante, puede ser indicativa de la funcionalidad de la hemostasia primaria. Se ha descrito que midiendo el **GPIb y FvW plaquetar** junto con el FvW plasmático se controlan los determinantes mayores de la hemostasia primaria (Kallis y cols. 1994).

Por otra parte, se han descrito también métodos para valorar la fase vascular de la hemostasia primaria, como sería el test o **índice de fragilidad plaquetar**, que se realiza mediante la utilización de un esfingomanómetro a 80 mm Hg durante 5 minutos para luego soltarse. De esta manera aparecen de 0 a 10 petequias en el miembro estudiado lo que constituiría dicho índice (Litter 1986).

### ***2.2.2 Parámetros de valoración de la hemostasia secundaria y la fibrinólisis***

El Tiempo de Protrombina (TP) y el Tiempo Tromboplastina Parcial Activada (TTPa) son los tests de grupo más utilizados. Se les llama tests de grupo (tests globales o de screening) puesto que tienen la capacidad de detectar defectos en un grupo de factores de

la coagulación simultáneamente, midiendo una porción de la cascada de la coagulación. Estos tests suelen realizarse sobre plasma citratado de forma relativamente simple y sus resultados suelen expresarse en tiempo y se comparan con unos valores de referencia dentro de un rango, que puede variar entre laboratorios (Hathaway y Goodnight 1993b). Aunque se trate de tests de grupo, al comparar los resultados de estos tests con otros adicionales como el TS o el Tiempo de Trombina (TT) en muchas ocasiones puede deducirse un diagnóstico etiológico preciso de un problema hemostático (Mischke y Nolte 2000).

### ***2.2.2.1 Tiempo de Protrombina***

El Tiempo de Protrombina (TP o Tiempo de Protrombina en un solo estado) es una medida de la actividad coagulante de la ruta extrínseca (también de la ruta común), incluyendo los factores FII (protrombina), FV, FVII y FX. El TP no se ve afectado por defectos en la función plaquetar o de los factores intrínsecos (Angelos y Hamilton 1986).

Para obtener un TP normal deben haber niveles adecuados de los factores antes mencionados y, como mínimo, 100 mg/dl de fibrinógeno (FI) en plasma. Cuando los niveles de uno de estos factores bajan al 30% de su nivel normal, se observa un alargamiento del TP. Este test es muy sensible para alteraciones del FVII y menos para deficiencias de protrombina o fibrinógeno (Angelos y Hamilton 1986).

El TP normal en conejo es de 7-8 segundos, en perro varía entre 7 y 10 segundos, y entre 9 y 13 segundos en gatos (Monreal y cols. 1993, Green 1997). En bóvidos se han descrito tiempos de entre 16-20 segundos según Alstad y cols. (1985) o 25-30 según Karges y cols. (1994). En caballo se han descrito valores de alrededor de 10-12,5 segundos (Monreal y cols. 1995a, Monreal y cols. 2000).



En general, cualquier alteración de la vía extrínseca se manifiesta por un alargamiento del TP pero manteniendo un nivel normal del TS y recuento de plaquetas. La mayoría de estas alteraciones son adquiridas y suelen ser debidas a intoxicaciones, tratamientos farmacológicos o enfermedades hepáticas. En bóvidos se ha descrito la intoxicación por dicumarol producido por contaminaciones fúngicas en heno de trebol dulce, que produce hipoprotrombinemia y alargamiento del TP corregible con vitamina K (Alstad y cols. 1985).

La vitamina K es necesaria para la síntesis del FVII y para la activación de los factores II, VII, IX y X y, por lo tanto, el diagnóstico diferencial del alargamiento del TP debe incluir la deficiencia de vitamina K así como malabsorción de las grasas, fallo hepático u obstrucción de las vías biliares, terapia con Warfarina o deficiencia de factores de la coagulación (Angelos y Hamilton 1986). En caso de deficiencias de Vitamina K estos factores se encuentran en niveles normales pero en forma inactiva (Angelos y Hamilton 1986). El test es poco sensible a la presencia de heparina y tampoco se ve afectado por trombocitopatías o trombocitopenias (Hackner 1995).

#### ***2.2.2.2 Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada***

El Tiempo de Tromboplastina Parcial (TTP) y el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPa) sirven para evaluar la ruta intrínseca (FXII, XI, IX y VIII) y común de la cascada de la coagulación. Tan sólo los factores FVII y FXII no son controlados (Hackner 1995, Angelos y Hamilton 1986).

El TTPa es de 22-38 segundos en el hombre. En conejo oscila entre 20 y 23 segundos, en perro entre 12 y 16 segundos, y en gato entre 14 y 20 segundos (Monreal y cols. 1993, Green 1997). En el caballo se han descrito valores más prolongados de entre 36 y 48 segundos (Monreal y cols. 1995a, Monreal y cols. 1995b, Monreal y cols. 2000). En bóvidos se han descrito valores de entre 32 y 38 segundos (Karges y cols. 1994).

El TTPa es muy sensible para la detección de alteraciones en la vía intrínseca (y/o común (Hackner 1995), particularmente deficiencias del FVIII y FIX. El TTPa no se alarga hasta que estos factores no descienden hasta el 25-30% de su valor normal, lo que parece acorde con la fisiología de los factores de coagulación en relación a situaciones clínicas (Angelos y Hamilton 1986). Si dichos factores continúan disminuyendo, el TTPa se alarga de forma exponencial, de modo que, cuando los factores están muy bajos, un ligero aumento o descenso de los mismos puede causar grandes variaciones en el TTPa. Sin embargo, partiendo de niveles adecuados de los factores, puede producirse un considerable descenso antes de observarse cambio alguno en el TTPa (Angelos y Hamilton 1986).

En el caso de un TTPa alargado el diagnóstico diferencial debe incluir: deficiencia de FXII, FXI (hemofilia C), precalikreína, kininógeno de alto peso molecular, FIX (hemofilia B), FVIII (hemofilia A), presencia de anticoagulantes (lupus), anticuerpos a FVIII o FIX, terapia con heparina, deficiencia de FII, FV, FX, hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia, DIC y enfermedad hepatocelular (Angelos y Hamilton 1986). Ambas formas de hemofilia se manifiestan con un alargamiento del TTPa con TP, TS y plaquetas normales. En el caso de la enfermedad de vW también se altera el TS (Angelos y Hamilton 1986). Este test no se ve influenciado por posibles trombocitopenias o trombocitopatías (Hackner 1995).

Los defectos de la vía común de la cascada de coagulación, normalmente adquiridos, se manifiestan por un alargamiento tanto del TTPa como del TP mientras que el TS y las plaquetas permanecen normales. Esto obedece a carencias de FV, X, II ó I (fibrinógeno).

### ***2.2.2.3 El Tiempo de Trombina***

El Tiempo de Trombina (TT) puede usarse para detectar deficiencias cuantitativas o

funcionales en el fibrinógeno. El test evalúa la reactividad del fibrinógeno a la trombina exógena mediante el tiempo que se tarda en convertir fibrinógeno en fibrina, saltando todos los pasos anteriores (Green 1997, Hackner 1995).

El TT se realiza añadiendo trombina al plasma del paciente y se mide el tiempo hasta la formación del coágulo siendo normalmente 14-21 segundos en humanos, 20-22 segundos en équidos, 38-46 segundos en conejo y 16-19 segundos en bóvidos (Monreal y cols. 1993, Karges y cols. 1994, Monreal y cols. 1995b). El TT se alarga cuando los niveles de fibrinógeno descienden por debajo de 100 mg/dl (en el hombre), o por la presencia de inhibidores (heparina o productos de la degradación de la fibrina) (Angelos y Hamilton 1986, Green 1997). Por ello, este test es también de gran utilidad para el seguimiento de pacientes con anormalidades de la fibrinólisis (Green 1997).

El TT no se ve afectado por deficiencias propias de la vía intrínseca o extrínseca (Angelos y Hamilton 1986, Green 1997).

#### ***2.2.2.4 Determinación del Fibrinógeno***

El fibrinógeno (FI) tiene la concentración más alta en sangre de entre todos los factores de coagulación (Green 1997). La determinación cuantitativa del fibrinógeno se realiza mediante la conversión del fibrinógeno en fibrina con trombina. El coágulo de fibrina se disuelve y se agrega un reactivo sensible a la presencia de fibrinógeno. La medición de la densidad óptica del resultante permite determinar la cantidad de fibrinógeno en sangre (Green 1997). En bóvidos se han descrito valores de 310-520 mg/dl y de 180-350 mg/dl en el hombre (Karges y cols. 1994). En caballo los valores normales oscilan entre 130 y 350 mg/dl (Monreal y cols. 2000), mientras que en conejos van de 290 a 390 mg/dl (Monreal y cols. 1993), y en perros y gatos van de 150 hasta 300 mg/dl (Green 1997).

El descenso en la concentración de fibrinógeno generalmente es indicador de su anormal

formación (enfermedad hepática) o su excesivo consumo (CID). Su aumento, por el contrario, es propio de animales con procesos inflamatorios o enfermedad renal (Couto 1999).

#### ***2.2.2.5 Productos de Degradación de la Fibrina***

Los Productos de Degradación de la Fibrina (PDF) se forman cuando la plasmina actúa sobre el fibrinógeno, fibrina o ambos, degradándolos en cuatro fragmentos (X, Y, D y E) (Green 1997, Couto 1999). Los PDF se detectan mediante anticuerpos anti-PDF y tienen una vida media de 9 a 12 horas. Su presencia induce anomalías hemostáticas porque deteriora la formación de fibrina mediada por la trombina, la polimerización de la fibrina y la formación del tapón plaquetario (Green 1997).

El resultado en circunstancias normales es generalmente negativo ( $<10 \mu\text{g/ml}$ ) (Hackner 1995, Monreal y cols. 2000). Un resultado positivo indicaría una fibrinólisis activa, aunque también se verá afectado en casos de hipercoagulación (Monreal y cols. 2000). Generalmente se asocia a CID, pero también es positivo en casos de trombosis arteriales o intoxicaciones por raticidas en perros y gatos (Couto 1999). La determinación específica del PDF más importante, el fragmento D (Dímero-D), se ha propuesto como marcador de estados trombóticos o de hipercoagulabilidad en los que la fibrinólisis está también estimulada para controlar los efectos del exceso de trombina (Otto y cols. 2000). En casos de CID, sin embargo, se ha observado un incremento de los PDF, debidos al estado de hipercoagulabilidad, junto a bajos niveles de dímeros-D, que indicarían un estado de hipofibrinólisis. Este cuadro es indicativo de un desequilibrio entre hipercoagulabilidad e hipofibrinólisis que agrava fatalmente la progresión de la CID (Monreal y cols. 2000).

### 2.2.3 Determinación de factores específicos

La actividad de factores de la coagulación específicos puede medirse por métodos coagulométricos mediante combinaciones de diluciones del plasma problema con plasma deficiente en algún factor y la realización de combinaciones de los tests antes descritos (Litter 1986), si bien actualmente se han desarrollado técnicas mucho más precisas. Existen diferencias importantes en la actividad de determinados factores de la coagulación entre diferentes especies, lo que hace necesario calibrar y estandarizar las técnicas analíticas para cada especie (Karges y cols. 1994, Mischke y Nolte 2000).

**Tabla 6. Actividad de varios factores de la coagulación, expresados en % del plasma humano normal, en plasma de diferentes especies animales**

Factor de coagulación	Bóvidos	Perro	Conejo
II	37-43	100	90-128
V	380-840	900	4400-5300
VII	5-9	300	26-72
VIII	320-512	880-1360	-
IX	168-250	170-640	-
X	17-26	96-170	32-45
XI	64-78	245-380	350
XII	154-240	90-200	160
HMWK	106-162	140-1120	-
XIII	41-62	200-220	250

Refs. Mischke y cols. 2000, Karges y cols. 1994.

Mediante técnicas cromogénicas o inmunológicas (inmunolectroforesis, radioimmunoassay (RIA) o enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)), pueden estudiarse la presencia de receptores específicos de las plaquetas, tales como GPIIb/IIIa -fibrinógeno, GPIb-factor, FvW, Dímeros-D (Monreal y cols. 1993, Otto y cols. 2000), antígeno tPA, actividad tPA, actividad y antígeno FvW plasmático y plaquetar, expresión de la GPIb de superficie (Angelos y Hamilton 1986, Kallis y cols. 1994), trombina, calicreína, plasmina, aPC etc. (Hathaway y Goodnight 1993b). También puede medirse el FvW a través de la cuantificación de la agregación plaquetaria por medio de un agregómetro (Green 1997).

Estos tests son, generalmente, cuantitativos y no miden la funcionalidad de la proteína detectada (Mischke y Nolte 2000); sin embargo, existen tests cromogénicos que permiten la evaluación funcional de muchos de los factores de coagulación. La liberación del cromóforo se mide por técnicas espectrofotométricas y permite determinar heparina, ATIII, antiplasmina, plasminógeno, activador del plasminógeno (Monreal y cols. 1993, Kallis y cols. 1994), FX, FVIII:C y trombina (Green 1997). El descenso de la actividad de la antitrombina III se observa en pacientes con enfermedad hepática, insuficiencia renal con pérdida de proteínas, enteropatías, terapia con heparina, estados de hipercoagulación (CID) o en casos severos del cólico en el caballo (Couto 1999, Monreal y cols. 2000).

#### ***2.2.4 Pruebas de uso experimental***

Durante la agregación plaquetar se produce liberación de **ATP** a partir de los cuerpos densos plaquetares. Midiendo la cantidad de ATP liberado en un agregómetro se puede tener una medida de la intensidad de la agregación. Al ser una determinación que no requiere ninguna reacción de tipo inmunológico es de las más utilizadas en investigación de todas las que miden productos de secreción plaquetar. En cambio, la determinación de otros productos como la **B-tromboglobulina**, el **FP4**, **factor de crecimiento plaquetar** o el **TXB<sub>2</sub>** se enfrenta al problema de la ausencia de reactividad cruzada a los anticuerpos de diferentes especies animales, por lo que su utilización en experimentación es mucho más complicada (Soloviev y cols. 1999). Otros tests descritos son la determinación de **cAMP**, **activación de la proteína C** (fosforilación de proteína) o el examen de la morfología plaquetar mediante microscopía electrónica (Ruiz de Gopegui y Feldman 1998). También se ha descrito la medición de la activación plaquetar mediante la determinación de la expresión de la **P-selectina** (Coulter y cols. 2000) o la detección de **anticuerpos monoclonales** frente a plaquetas activadas y **microagregados plaquetares** mediante citometría de flujo en sangre bovina (Baker y cols. 1998).

En terneros se ha descrito la valoración, mediante técnicas inmunológicas, de fragmentos de péptidos liberados durante el proceso de formación del coágulo, como **TAT** (Thrombin-antithrombin III complex), **TXB<sub>2</sub>**, **GPIIb/IIIa** y **fosfolípido de membrana**, si bien los autores no consiguieron medir en esta especie otros fragmentos como F1+2, D-Dimer, beta-TG, FP4, los receptores para fibronectina, trombospondina ni FvW (Harasaki y cols. 1995).

Por otra parte, recientes avances en el conocimiento de la coagulación sanguínea han tenido como resultado el desarrollo de nuevos métodos experimentales para diagnosticar estados pretrombóticos, los cuales se basan en la detección de ciertos **marcadores** por técnicas, preferentemente, de ELISA. Estos marcadores pueden clasificarse en varios grupos (Monreal y cols. 1993, Roncalés y Sancho 2000):

- Factores de la coagulación activados: *FVIIa (marcador de la vía extrínseca) y F XIIIa.*
- Péptidos de activación: *FIX y FX activation peptides, Fragmentos de protrombina 1+2, Fibrinopéptidos A y B, Péptido de activación de la proteína C.*
- Complejos enzima-inhibidor: *FX- Inhibidor; FXI-Inhibidor, Thombin-antithrombin Complex (TAT), Proteína C-Inhibidor.*
- Marcadores de la activación de la fibrinólisis: *Complejos plasmina-antiplasmina; Dímeros-D, Fragmento E, \_-péptido 15-42.*

## **2.3 Uso de hemostáticos en terapéutica veterinaria**

### **2.3.1 Situaciones clínicas**

Las situaciones en las cuales se rompe el equilibrio hemostático, en uno u otro sentido, de forma que es necesaria una intervención terapéutica pueden tener múltiples causas. Los estados de hipercoagulabilidad, con tendencia a la trombosis, son los casos que más preocupan y que pueden conllevar situaciones más comprometidas en medicina humana e incluso en la clínica canina o equina (Otto y cols. 2000). Sin embargo, en la clínica bovina y en general en la de animales de abasto, suele tener más trascendencia el desequilibrio hacia el lado opuesto, es decir, hacia un aumento de la tendencia a la hemorragia. Esto se suele producir por una disminución en la actividad de los factores de la coagulación, disminución del número de plaquetas (trombocitopenia) o malfuncionamiento plaquetar (trombopatías). En ocasiones se produce en conexión con hiperfibrinólisis consecuencia de un cuadro de CID. La presencia de CID puede evidenciar cualquiera de los dos desequilibrios del sistema hemostático, ya que la hipercoagulabilidad podría llegar a producir un estado de hipocoagulabilidad por el consumo excesivo de factores de coagulación (Mischke y Nolte 2000).

Las alteraciones de la hemostasia de tipo hereditario en el ganado bovino son muy raras (Básicamente: Hemofilia A, Hemofilia B y Enfermedad de vW), siendo más frecuente que sean de tipo adquirido, como intoxicaciones cumarínicas, CID, trombocitopenias inmunomediadas, alteraciones hepáticas, tratamientos farmacológicos, etc (Mischke y Nolte 2000). La hemofilia se observa tanto en los animales como en el hombre y es debida a un defecto del factor VIII. La parahemofilia (hemofilia B o enfermedad de Christmas) es debida a la carencia de factor IX y es clínicamente indistinguible de la hemofilia clásica, habiendo sido ambas descritas en el perro, gato, caballo y bóvidos (Dodds 1988, Marcato 1990). En bóvidos afectados por el equivalente del síndrome



Chédiak-Higasi se observa una ausencia de gránulos densos en sus plaquetas. Estos animales muestran, entre otros síntomas, una tendencia a la hemorragia que puede ser atribuida en parte a la deficiencia en la secreción de agonistas que normalmente se almacenan en los gránulos densos plaquetares (Meyers y cols. 1982). También se ha descrito una alteración de la agregación plaquetar de carácter hereditario en ganado Simmental (Grubbs y Olchowy 1997).

Como trastornos adquiridos en bóvidos se ha descrito la intoxicación por dicumarol producida por contaminaciones fúngicas en el heno de trebol dulce, que produce hipoprotrombinemia y alargamiento del TP corregible con Vitamina K (Alstad y cols. 1985, Grubbs y Olchowy 1997). En los terneros que consumen trebol dulce fermentado aparecen lesiones hemorrágicas difusas y una anemia grave, algunas veces mortal (“Sweet clover disease”) (Marcato 1990). La warfarina y otros derivados dicumarínicos (cumacloro, cumatetralil, fumarin), utilizados como veneno para roedores tiene un efecto anticoagulante semejante al dicumarol (antagonistas de la vitamina K) y produce frecuentes envenenamientos en diversas especies animales (perro, gato, cerdo). Los envenenamientos en bóvidos se suelen producir de foma accidental al ser mezclados con cereales para actuar como cebo de roedores o por contaminaciones accidentales. Si bien precisa de una administración reiterada, en los animales envenenados se observan numerosos focos hemorrágicos en los tejidos blandos y derrames en las cavidades, especialmente el pericardio (Marcato 1990).

En casos de CID, la activación de la hemostasia resulta en un incremento incontrolado de generación de trombina que supera a los inhibidores hemostáticos, consume factores procoagulantes y plaquetas e induce trombosis. La formación de trombos y la subsiguiente isquemia y necrosis pueden aumentar la respuesta fibrinolítica, que altera aún mas la función plaquetar, consume factores de coagulación y resulta en hemorragias severas (Ruiz de Gopegui y Feldman 1998). De este modo, la CID induce trombocitopenia, trombocitopatía y coagulopatía, y está asociada a numerosos procesos

tanto de curso agudo como crónico tales como hemólisis intravascular, sepsis, complicaciones obstétricas, dilatación gástrica, vólvulos, cólicos, enteritis, diabetes mellitus, neoplasias, shock traumático, infarto de miocardio, hepatopatías severas, veneno de serpientes o arácnidos, pancreatitis e incluso a algunas parasitosis (Valladares y cols. 1998).

En el ganado bovino se presentan otros trastornos de la coagulación de la sangre en enfermedades agudas septicémicas, como el carbunco, así como en enfermedades con graves lesiones hepáticas y en la ictericia por estasis. En terneros se han descrito alteraciones de la coagulación debidas a la infestación con *Sarcocystis cruzi*, observándose una actividad reducida de los factores V, VII o X (Daugshies y cols. 1998).

Por otra parte, se ha descrito que las alteraciones hepáticas pueden causar deficiencias de protrombina, fibrinógeno, proacelerina o vitamina K (Marcato 1990). Sin embargo, la enfermedad hepática, puede producir trombocitopatías antes de que haya producido una disminución significativa de los factores de coagulación, por ejemplo reduciendo la glicoproteína GPIb, lo que interfiere en la adhesión plaquetar o aumentando los productos de degradación de la fibrina (Dímero-D y Fragmentos E), lo que interfiere en la agregación plaquetar. También puede inducir hiperamonemia, que producirá L-arginina, la cual puede incrementar la producción de ON, alterando también la función plaquetar. En último término es cuando puede fallar la síntesis de proteínas de la hemostasia, que en su mayoría se sintetizan a nivel hepático (Ruiz de Gopegui y Feldman 1998).

En caso de nefropatías puede producirse una pérdida importante de proteínas, llegando a producir hipoalbuminemia. Esta situación puede producir hiperfibrinogenemia, trombocitosis y pérdida de ATIII que desemboca en un estado de hipercoagulabilidad. Por otra parte, pueden darse casos de insuficiencia renal en que se produce un cuadro

urémico, que conduce a un desequilibrio entre la síntesis de PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>, causando alteraciones en la agregación. También puede darse una disminución en las concentraciones plaquetares de ADP y ATP, y un aumento de la activación de la trombina y plasmina, que activarían las plaquetas e inducirían la secreción endotelial de PGI<sub>2</sub> y ON, inhibiendo la hemostasia (Ruiz de Gopegui y Feldman 1998).

En diversas especies animales se ha descrito también la existencia de púrpuras hemorrágicas, caracterizadas por pequeñas petequias de origen capilar, que suelen estar producidas por micotoxinas (estaquibotriotoxicosis del caballo, fusariotoxicosis en el hombre), por enfermedades autoinmunes (púrpura trombocitopénica por isoimmunización de los lechones), secundaria a otras enfermedades (anasarca o fiebre petequeal del caballo) o de carácter hereditario (púrpura plaquetopática) (Marcato 1990).

En neumonías causadas por *Pasteurella haemolytica* en bóvidos se ha descrito la presencia de agregados plaquetares en los capilares pulmonares que se ha comprobado que son consecuencia de un aumento de la sensibilidad de las plaquetas a los agonistas de la coagulación debida directamente a la presencia del germen o de proteínas secretadas por el mismo como la leucotoxina o la sialoglycoproteasa, que podría ser la inductora de la lisis plaquetar (Clinkenbeard y Upton 1991, Cheryk y cols. 1998, Niarko y cols. 1998).

Asimismo, las infecciones con el virus de la BVD tipo II pueden producir un síndrome hemorrágico que incluye epistaxis, leucopenia, pirexia y hemorragias en múltiples órganos, puntos de inoculación o picaduras de insectos, diarrea sanguinolenta y finalmente muerte. En esta enfermedad la función plaquetar de terneros infectados por el serotipo II se ve alterada probablemente por un envejecimiento de las plaquetas circulantes, consecuencia de la trombocitopenia inducida por la enfermedad, o una interacción directa virus-plaqueta (Walz y cols. 1999). El mecanismo por el cual la infección por este virus produce la destrucción o secuestro plaquetar conducente a esta

trombocitopenia no está tampoco completamente descrito, aunque parece ser que no es de naturaleza inmune (Corapi y cols. 1990).

También es relativamente frecuente la presencia de úlceras de abomaso, que pueden llegar a ser profundas y causar hemorragias profusas. Aparecen en el curso de determinadas enfermedades como enfermedad de las mucosas, peste bovina y fiebre catarral maligna o bien en caso de ingestión de venenos corrosivos, desplazamiento de abomaso o al destete en animales jóvenes. Existen también numerosas causas predisponentes, muchas de ellas relacionadas con el final de la gestación, parto o pico de lactación así como enfermedades concurrentes como metritis, mastitis, cetosis o hígado graso. Las úlceras pépticas crónicas suelen afectar a vacas de alta producción, posiblemente debidas al stress propio del parto y del comienzo de la lactación. En este caso suelen mostrar síntomas de inapetencia, enflaquecimiento, sangre en heces, etc. Sin embargo, en casos agudos pueden aparecer hemorragias abundantes que pueden desembocar en anemias en pocas horas (Sanchez-Garnica 1971a, Welchman y Baust 1987, Zadnik y Mesaric 1999, Ok y cols. 2001).

Todos estos casos corresponden a fallos o defectos del sistema hemostático generalmente secundarios a otros procesos. En la práctica clínica de bóvidos, sin embargo, tienen mayor trascendencia los problemas derivados de hemorragias inducidas por la propia intervención del veterinario, bien a través de la cirugía o de maniobras de tipo obstétrico.

A nivel quirúrgico, la existencia de una predisposición por parte del paciente se puede prever en un examen de valoración preanestésica al comprobar si hay o no un alargamiento del TS o una alteración de los parámetros enzimáticos hepáticos, si bien, como ya ha sido comentado, la habilidad del test del TS para prevenir estas situaciones es limitada (Lind 1991). Sin embargo, la habilidad del cirujano y las difíciles condiciones de trabajo en la cirugía bovina pueden inducir a un excesivo sangrado que puede resultar

muy perjudicial para la adecuada recuperación del paciente. Aparte de los conocimientos de anatomía y de la habilidad del cirujano, se han descrito diferentes técnicas para disminuir en lo posible la pérdida de sangre, que no siempre son simples o carentes de riesgos significativos para el paciente (Deacock y Birley 1969). Lo más inmediato es el posicionamiento adecuado del paciente y la arteriotomía o ligadura del vaso sangrante. También pueden utilizarse drogas procoagulantes o protectoras de la pared endotelial. Finalmente, una vez se ha producido una pérdida importante de sangre cabe el recurso a la fluidoterapia e incluso a la transfusión de sangre entera o de factores de coagulación. La transfusión de sangre está indicada para pérdidas de sangre masivas con hematocritos inferiores al 20%. En la clínica veterinaria del ganado bovino, históricamente se han utilizado con éxito transfusiones de sangre entera en hemorragias graves o en procesos como la hemoglobinuria puerperal (Meyer y Schaetz 1969, Sanchez-Garnica 1971b, Blood y cols. 1983). En este sentido hay abundancia de donantes, puesto que la incompatibilidad de grupos sanguíneos es muy rara en bóvidos y, a nivel práctico, no suele hacerse distinción entre grupos sanguíneos (Sellon 2000).

Por otra parte, a nivel obstétrico, en caso de prolapsos de vagina, partos laboriosos o cesáreas con rotura de vasos en el útero, puede producirse una hemorragia de intensidad variable que pudiera incluso llevar a la aparición de anemia (Sanchez-Garnica 1971c, García 1981).

### **2.3.2 Agentes utilizados en la terapia hemostática**

En la terapia de la hemostasia caben dos situaciones en las que hay que intervenir: la necesidad de evitar un exceso de coagulación que pudiera dar lugar a trombosis o bien el caso contrario, es decir, la necesidad de controlar una tendencia o exceso de hemorragia.

El **tromboembolismo** puede tratarse, generalmente a nivel preventivo, mediante diferentes agentes que interfieren en alguna fase de la hemostasia tales como la **heparina y sus derivados, derivados cumarínicos** (Adams 1982, Torrente y Guitart 1999, Dickneite y cols. 1998), **agentes fibrinolíticos** (plasmina, estreptokinasa-estreptodornasa, urokinasa o t-PA) (Ruiz de Gopegui y Monreal 2000), inhibidores de la ciclooxigenasa como los **AINEs**, principalmente la **aspirina** (Jackson 1987, Bastos da Silva 1998) y diversos **antagonistas de receptores plaquetares** (Szczeklik y cols. 1992, Pogliani y cols. 1992, Cameron 1999, Boersma y cols. 1999, Bankhead 2000, Bastos da Silva y cols. 1997, Jaarsma y cols. 1993).

Por otra parte, el **control de la hemorragia** por medio de agentes terapéuticos puede ejercerse **a nivel local o tópico**, generalmente en el caso de intervenciones quirúrgicas, o bien **a nivel sistémico** para paliar defectos de la coagulación, hereditarios o adquiridos, o para el mejor control postoperatorio.

#### *2.3.2.1 Tratamientos hemostáticos tópicos*

Hay diversas sustancias que pueden ayudar al control de la hemorragia de origen capilar a nivel tópico siempre y cuando el sistema hemostático se mantenga funcional. En caso de deficiencias de la hemostasia o alteraciones de la fibrinólisis, los agentes tópicos tienen poco valor, debiendo recurrirse a transfusiones de sangre entera o de alguna de sus fracciones (Adams 1982). Como antihemorrágicos tópicos en clínica bovina se han utilizado corrientemente sustancias astringentes como el **nitrate de plata** o el **percloruro de hierro** al 5% (Sanchez-Garnica 1971d). También se ha descrito el uso de **sulfato de hierro, ácido tánico, trióxido de cromo** o **cloruro de zinc**. La actividad de estas sustancias depende de la precipitación de las proteínas de la sangre y tejidos blandos, sellando así la rotura vascular. Esta reacción puede llegar, en algunos casos, a causar un cierto daño tisular (Adams 1982).

Al margen de estos astringentes, existen otras sustancias de uso tópico encaminadas a proveer de una matriz artificial para facilitar la formación del tapón hemostático o bien a acelerar los procesos de coagulación, que se describen a continuación (Adams 1982):

- **Tromboplastina:** Extraída del pulmón o cerebro del conejo o bovino, se utiliza en cirugía por aplicación directa mediante spray o esponja, promoviendo así la conversión de protrombina en trombina *in situ*.
- **Trombina:** Generalmente de origen bovino, se utiliza cuando hay sangrado de tejidos parenquimatosos, hueso, encías, en cirugía de la laringe, nasal o reconstructiva. También se ha utilizado en hemorragias gastrointestinales. Se aplica tópicamente como polvo o en solución o bien en combinación con esponjas de gelatina. Nunca debe administrarse parenteralmente.
- **Fibrinógeno:** De origen humano, se suele utilizar sobre mucosas erosionadas o bien de forma sistémica para restaurar las concentraciones fisiológicas normales tras hemorragias masivas o en hipofibrinogenemia. Para su efectiva conversión en fibrina es necesario que existan niveles suficientes de trombina.
- **Espuma de fibrina:** Es un material esponjoso preparado a partir de fibrinógeno humano que se utiliza directamente, con cierta presión, sobre la zona hemorrágica para evitar la pérdida de sangre.
- **Esponja de gelatina:** Es una esponja de gelatina que absorbe sangre entera hasta varias veces su peso. Se utiliza primordialmente para el sangrado capilar o venoso. Suele estar impregnada de trombina bovina y se deja en el área hemorrágica tras el cierre de heridas quirúrgicas, donde se reabsorbe en pocas semanas.

- **Celulosa (Oxidized):** Es un tipo especial de gasa quirúrgica que ayuda a la coagulación mediante la interacción entre la hemoglobina y el ácido celulósico. Cuando interacciona con la sangre y los fluidos facilita la formación de una matriz gomosa para la formación del coágulo. Es un remedio temporal que no debe dejarse permanentemente al interferir con la regeneración ósea y la reepitelización.
- **Colágeno microcristalino:** Se usa sólo a nivel experimental adheriéndose rápidamente a las superficies húmedas y siendo reabsorbido en unas 6 semanas. Es efectivo en deficiencias de factores de la coagulación o en pacientes heparinizados, pero menos en trombocitopenias. Tiene buena eficacia en anastomosis venoarteriales o cirugía del bazo o hígado.
- **Epinefrina y norepinefrina:** En su aplicación tópica, producen una vasoconstricción inmediata. Aunque transitoria, esta vasoconstricción puede ser suficiente para el control del sangrado de pequeños vasos.

### ***2.3.2.2 Tratamientos hemostáticos sistémicos***

En pacientes humanos con trombocitopenia o disfunciones plaquetares, en los que es frecuente un sangrado excesivo tras cualquier trauma menor, hemartrosis, hematomas, hematuria e incluso hemorragias gastrointestinales o en mucosas o piel, está indicada la transfusión de **concentrado de plaquetas**, obtenidas por centrifugación a partir de sangre de uno o varios donantes (Hathaway y Goodnight 1993f).

Cuando ocurre una deficiencia en uno o varios factores de la coagulación (II, V, VII, VIII, IX, X, XI o XIII) o en el curso de CID, también se ha recurrido a la administración de plasma congelado (**Fresh Frozen Plasma**) o de **sangre entera**. Como en el caso de otros componentes sanguíneos, la transfusión de sangre entera o de plasma siempre



conlleva un cierto riesgo de transmisión de enfermedades víricas o de reacciones inmunes, por lo que siempre que se encuentre disponible es más segura la administración de concentrados del factor específico deficiente.

Cuando el plasma se descongela, se produce una fracción de proteína plasmática insoluble que contiene elevadas cantidades de factor VIII y fibrinógeno denominada **crioprecipitado**. Esta fracción se utiliza corrientemente para el tratamiento de defectos cuantitativos y/o cualitativos, del factor VIII, que pueden darse en caso de hemofilia A o enfermedad de vW. La **adrenalina**, **epinefrina** o el ejercicio intenso también han resultado en mejoras temporales de la coagulación en estos pacientes al aumentar los niveles del factor VIII. Para tratamientos más específicos y exentos de otros riesgos, en humanos se utilizan concentrados de factor VIII, IX y FvW, si bien también se ha descrito la administración de concentrados específicos de diversos factores como II, VII, X, XI o XIII (Litter 1986, Hathaway y Goodnight 1993f).

El **salicilato de carbazocromo** es una sal soluble de adrenocromo, un producto de oxidación de la epinefrina, se ha utilizado en animales para el control de la hemorragia pre o post-operatoria, con una efectividad cuestionada (Adams 1982). En pacientes humanos se ha utilizado la **monosemicarbazona adenocromo** a partir de la década de los 40, si bien su eficacia no llegó a establecerse con claridad (Deacock y Birley 1969).

El **sulfato de protamina** es una proteína de bajo peso molecular que se encuentra en el esperma de algunos peces. Se combina con la heparina formando una sal estable que inactiva sus efectos anticoagulantes, si bien también tiene algún efecto anticoagulante por sí mismo. Su uso se limita frente a hemorragias causadas por el propio uso de la heparina (Adams 1982).

Más recientemente se ha utilizado, en humanos, la terapia con la hormona antidiurética **vasopresina**, **L-arginina vasopresina (ADH)**, o su **análogo sintético** 1-desamino-8-d-

arginina vasopresina (**DDAVP o desmopresina**) (Dickneite y cols. 1998). La DDAVP muestra una buena eficacia durante 6-24 horas, sin riesgo de transmisión de enfermedades y con poca incidencia sobre la presión arterial, vasoconstricción o actividad peristáltica intestinal o uterina. Tanto DDAVP como ADH tienen la propiedad de aumentar los niveles circulantes de FVIII:C y FvW y son efectivos en el tratamiento de la hemorragia en pacientes con alteraciones leves o moderadas debidas a defectos funcionales de las plaquetas, desórdenes hemorrágicos relacionados con uremia, cirrosis hepática, hemofilia moderada, enfermedad de vW, trombocitopenia, así como en pacientes bajo cirugía mayor (Hathaway y Goodnight 1993f). Su administración acorta el TS tanto en pacientes enfermos como sanos, por lo que muestra un gran potencial para la prevención de la hemorragia en pacientes con hemostasia normal que vayan a someterse a cirugía mayor (Salva y cols. 1998). Asimismo, su administración conjunta con etamsilato ha demostrado cierta sinergia frente a diversos procesos (Kobrinisky y cols. 1991).

Los **agentes antifibrinolíticos** inhiben la plasmina y al activador de enzimas fibrinolíticos tPA (tissue plasminogen activator) y se han demostrado como eficaces en el tratamiento de estados de fibrinólisis sistémica (hereditarios o consecuencia de tratamientos trombolíticos) o local (sangrado gastrointestinal, vías respiratorias altas, aparato genitourinario, etc.) y también en la prevención del sangrado postoperatorio en diversos estudios, especialmente en cirugía cardíaca, reduciendo como resultado la necesidad de transfusiones en pacientes humanos. Las diferencias de eficacia entre ellos no están claramente demostradas y su seguridad en cuanto a la posibilidad de complicaciones de origen trombotico ha sido a veces cuestionada, originando una cierta controversia al respecto. Los principales agentes de este tipo son la aprotinina, epsilon-ácido aminocaproico y el ácido tranexámico (Litter 1986, Hathaway y Goodnight 1993f, Hardy y Belisle 1994):

La **aprotinina** (Trasyol) es un inhibidor inespecífico de la proteasa sérica, derivado del pulmón bovino, con actividad anti-fibrinolítica. Su mecanismo de acción parece ser a través de la inhibición de la fibrinólisis y favorecimiento de la adhesión plaquetar, aunque sin efectos sobre la agregación (Kallis y cols. 1994). A bajas dosis ha demostrado reducir la pérdida de sangre durante operaciones cardíacas en humanos, incluso en pacientes que tomaron aspirina previamente a la intervención (Adams 1982). En recientes estudios ha demostrado su eficacia administrada en el post-operatorio: Tras el tratamiento, los pacientes que recibieron aprotinina sangraron menos, mostraron niveles superiores de hemoglobina y mostraron mayor expresión de GPIb, niveles de fibrinógeno y actividad de FvW plaquetar así como disminución en la actividad y antígeno tPA. Sin embargo, no influyó en la agregación plaquetar, FvW plasmático o el recuento de plaquetas. En un estudio de su eficacia en transplantes de hígado en humanos se demostró la reducción de la pérdida de sangre perioperatoria en porcentajes de entre 44 y 60% sin observarse un aumento de la incidencia de fenómenos tromboembólicos (Porte y cols. 2000). Sin embargo, Langdown y cols. (2000) no lograron demostrar su eficacia en la reducción del sangrado durante las artroplastias. También ha demostrado su eficacia frente al shock hemorrágico siendo frecuentemente usado en combinación con el ácido tranexámico (Verstraete 1985).

El **ácido tranexámico** es un agente antifibrinolítico que inhibe competitivamente la conversión de plasminógeno en plasmina. Se ha demostrado una eficacia similar a la aprotinina en la reducción del sangrado en cirugía coronaria (Bernet y cols. 1999). También es eficaz en intervenciones de transplantes de hígado (Dalmau y cols. 2000). Sin embargo, no pudo demostrarse su eficacia en la prevención de la hemorragia peri-intraventricular en neonatos prematuros (Chen 1993). Su principal indicación es la prevención del exceso de sangrado tras la tonsilectomía, cirugía prostática y la menorragia así como otras intervenciones y patologías que

cursan con exceso de hemorragia. Sus principales efectos secundarios son náuseas y diarrea (Verstraete 1985, Dunn y Goa 1999).

También el **ácido mefenámico** ha demostrado su capacidad para reducir las pérdidas de sangre durante la menstruación (Chamberlain y cols. 1991) y una eficacia similar a la aprotinina en la reducción del sangrado en cirugía cardíaca (Casati y cols. 2000).

El **ácido aminocaproico** ha demostrado poseer similar eficacia a la aprotinina o al ácido tranexámico en la reducción del sangrado postoperatorio en cirugía cardíaca en humanos (Chauhan y cols. 2000, Maineri y cols. 2000), si bien algunos autores reportan menor eficacia que otros agentes antifibrinolíticos (Adams 1982, Pinoski y cols. 1997, Casati y cols. 1999, Dalmau y cols. 2000).

También se ha descrito el uso empírico del **formaldehído** como hemostático en caballos (Schumacher y cols. 1998, Marriot y cols. 1999). Sin embargo, recientes estudios diseñados específicamente no han conseguido demostrar su eficacia en esta especie tras la infusión intravenosa de diferentes dosis (Taylor y cols. 2000).

En el caso particular de la clínica del ganado vacuno, muy pocos de los agentes hemostáticos descritos han sido utilizados rutinariamente. En esta especie se ha descrito la utilización de sangre entera mediante transfusiones, así como de Vitamina K, sales de calcio, Vitamina C y vasoconstrictores tipo adrenalina (Sanchez-Garnica 1971d). La vitamina K, esencial para la síntesis de diversos factores de la coagulación, se utiliza en ganado bovino como un antídoto frente a las intoxicaciones cumarínicas, generalmente por consumo de heno de trebol dulce fermentado (Alstad y cols. 1985), aunque también en el caso de alteraciones hepáticas (Adams 1982). Aparte de la vitamina K, el único agente comercializado actualmente para el control de la hemorragia en cirugía y

obstetricia en la especie bovina es el **etamsilato**, el cual se describe ampliamente en el capítulo 2.4.

## 2.4 Etamsilato

### 2.4.1 Introducción

El etamsilato (también conocido como Ciclonamina, Dicinona, 141-E, o dihidroxi-1,4-bencenosulfonato-3 de dietilamina) es un fármaco de la familia de los becenosulfonatos, derivado de la ciclodixadienolona, que ha sido usado en distintos países como hemostático en la clínica humana y posteriormente en clínica veterinaria a lo largo de aproximadamente 30 años.

El producto comercializado para su uso en personas, está indicado para la *“prevención y tratamiento de las hemorragias, en cirugía y de las hemorragias médicas pulmonares, digestivas, renales, ginecológicas, etc., así como para la prevención y tratamiento de las alteraciones vasculares (fragilidad y permeabilidad aumentadas)”* sin describirse ningún tipo de contraindicación o efecto secundario (HEMO 141<sup>ii</sup>, DICINONE<sup>iii</sup>). Asimismo, de acuerdo con la bibliografía existente, el etamsilato se ha demostrado eficaz frente a diversos procesos en medicina humana, como son la reducción del sangrado de heridas (Canal 1964, Laporte y Esteve 1967, Esteve y cols. 1959, Deacock y Birley 1969), en la prevención de hemorragias intraventriculares en neonatos prematuros (Chen 1993, Ment y cols 1984), frente a menorragias menstruales (Chamberlain y cols. 1991) y en la reducción del sangrado postoperatorio (EMEA 1998, Cornet 1969). Asimismo, la actividad hemostática del etamsilato ha sido reiteradamente demostrada mediante la reducción del TS en especies de laboratorio y en el hombre (Esteve y cols. 1959, Esteve

---

<sup>ii</sup> HEMO 141 (etamsilato). Prospecto del producto. Laboratorios Dr. Esteve S.A. 1995.

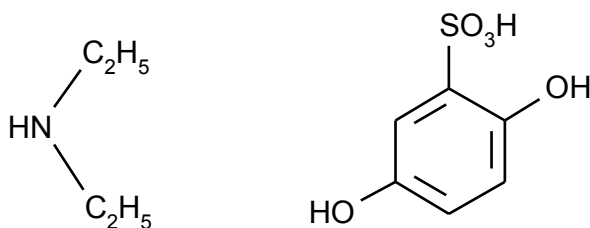
<sup>iii</sup> DICINONE (etamsilato). Prospecto del producto. Laboratorios P.E.N, S.A.

y cols. 1960a, Laporte 1961, Laporte y Esteve 1965, Laporte y Esteve 1967, Chanal 1969, Esteve y cols. 1968, Canal 1964, Vinazzer 1980).

En medicina veterinaria también se ha utilizado ampliamente para la prevención de hemorragias en procedimientos quirúrgicos y en manipulaciones obstétricas (EMEA 1998) estando indicado actualmente en todas las especies animales con estas mismas indicaciones (HEMO 141 Sol Iny)<sup>iv</sup>. Sin embargo, a pesar de su amplia utilización tanto en ganado vacuno como en otras especies, han sido muy pocos los estudios científicos publicados que avalen su eficacia en estas indicaciones en animales domésticos. Por otra parte, su tolerancia se considera excelente en todas las especies, si bien las evidencias científicas al respecto son escasas, salvo en animales de laboratorio y en el hombre.

#### **2.4.2 Descripción y caracterización**

El etamsilato, en su forma pura, se presenta como un polvo blanco, cristalino, inodoro e insípido, muy soluble en agua, soluble en etanol e insoluble en éter (coeficiente de partición lípidos/agua <0,1). En el organismo se encuentra principalmente en su forma ionizada a cualquier pH. Su fórmula empírica es C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>S, con un peso molecular de 263,33. Su fórmula desarrollada es la siguiente (Budavari y cols. 1989):



---

<sup>iv</sup> HEMO 141 (etamsilato). Prospecto del producto. ESTEVE VETERINARIA Laboratorios Dr. Esteve S.A. 1995.

En las presentaciones comerciales disponibles se encuentra en forma de solución inyectable, para su administración por vía IV o IM en todas las especies animales (HEMO 141 Sol iny). Para la especie humana se encuentra en forma de comprimidos orales (DICINONE) o en forma de solución inyectable (HEMO 141).

### **2.4.3 Mecanismo de acción.**

Según se ha descrito, el etamsilato presenta tres tipos de acciones: hemostática, angioprotectora y antiinflamatoria. A continuación se describen los trabajos que han profundizado en los mecanismos responsables de estas acciones del etamsilato.

#### ***2.4.3.1 Acción hemostática del etamsilato***

Esteve y cols. demostraron ya en 1959 que la administración de etamsilato acorta el TS sin producir alteración alguna en el tiempo de protrombina. En 1960 Esteve y cols. (1960a) observaron que el etamsilato contrarresta el alargamiento del TS producido por el salicilato sódico, mientras que no tiene efecto alguno sobre la acción ejercida por la heparina. En posteriores investigaciones, Laporte (1964) y Esteve y Laporte (1965) demostraron que la acción del dextrano sobre las plaquetas se contrarresta mediante la administración previa de etamsilato, pero no si la administración se realiza en orden inverso. Por otra parte Gaillez (1966) demostró que era necesaria una cantidad mínima de plaquetas en sangre para que el etamsilato ejerciera su efecto, por lo que en caso de trombopatías severas podría no ser de utilidad. Estos trabajos, junto con los estudios fotométricos in vitro llevados a cabo por Raby y Coupier (1965), Cañadell (1966) y Cornet (1969) condujeron a pensar que **el efecto del etamsilato debía producirse sobre la hemostasia primaria**, sin modificación del número de plaquetas. Estos

---

autores constataron que la actividad del etamsilato a 37°C es mucho menor que a temperaturas inferiores (30°C), que son las que pueden encontrarse en caso de hemorragias externas y también en muchos casos de cirugía. Según los autores, ello podría también explicar porqué el etamsilato no induce trombosis en la circulación sistémica y sí en caso de heridas externas. Esta teoría no ha tenido mayor repercusión en publicaciones posteriores.

Otros autores (Berkada y Akokan 1966) estudiaron el efecto del etamsilato sobre la formación de tromboplastina y sobre las plaquetas en pacientes humanos. Sorprendentemente, el tiempo de coagulación obtenido por el test de la tromboplastina se redujo significativamente, si bien su efecto fue efímero. Los autores concluyen que el etamsilato acelera la formación de tromboplastina intrínseca, pero no aumenta la cantidad total formada. Esta observación contradice lo observado por otros autores y que ha sido descrito anteriormente ya que implica una acción sobre la coagulación de la sangre más allá de la hemostasia primaria. Este fenómeno no ha sido confirmado en la bibliografía publicada posteriormente. Por otra parte, los ligeros aumentos en la adhesividad y agregación plaquetaria no alcanzaron significación estadística. Al parecer, según estos autores, los efectos sobre la adhesividad y agregación plaquetar sólo se evidenciarían en plaquetas con deficiencias de coagulación y no en plaquetas normales.

Gökay y cols. (1966) estudiaron tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” la acción del etamsilato sobre la agregación plaquetar y observaron un aumento en el número de plaquetas y una aceleración en la agregación así como una disminución en el tiempo de sangrado. Sack y Dujvone (1973), mediante estudios turbidométricos y de microscopía electrónica, también observaron la inducción de la agregación plaquetar *in vitro* de plaquetas humanas producida por el etamsilato, si bien postulan que el mecanismo de acción responsable de la agregación inducida por el etamsilato es diferente al inducido por otros compuestos como el ADP, trombina, colágeno o FP-3. Sin embargo, la agregación fue de pequeños grupos de plaquetas y no fue acompañada de formación de



pseudópodos tal como induce el ADP, de manera que no se produjeron modificaciones en la superficie externa de las plaquetas y la distribución interna de sus gránulos. La agregación inducida por el etamsilato no se vió influida por inhibidores de la agregación por ADP tan potentes como la adenosina o el AMP. Según estos autores la aspirina tampoco inhibe la agregación inducida por etamsilato. Por otra parte, la presencia de Calcio y fibrinógeno no es indispensable para la acción del etamsilato, pero sí que la potencian en intensidad y velocidad de agregación plaquetar. En base a estos resultados, los autores propusieron un mecanismo de acción del etamsilato relacionado con la inducción de cambios electrostáticos en la membrana plaquetar. Por su parte, Sack y Cerutty (1973) propusieron que el etamsilato podría actuar, al igual que las macromoléculas cargadas, mediante su adhesión a la membrana plaquetar cargada negativamente, reduciendo dicha carga (y por tanto su fuerza repulsiva) y formando puentes entre plaquetas adyacentes.

Años más tarde, Vinazzer (1980) observó un aumento de la adhesión plaquetar y un moderado incremento en la agregación máxima inducida por colágeno o epinefrina en pacientes humanos tras la administración de dosis altas de etamsilato. En un intento de descifrar su mecanismo de acción el autor propone una **acción directa sobre el vaso sanguíneo, sobre la membrana plaquetar o una inhibición de la PGI<sub>2</sub>**. Por su parte, Okuma y cols. (1982) demostraron que el etamsilato incrementa la agregación plaquetar inducida “*in vitro*” por el AA y el colágeno además de facilitar la liberación de ATP, si bien no produjo ningún efecto sobre la agregación producida por el ADP o la epinefrina. Los autores confirmaron que este efecto se conseguiría por un mecanismo independiente de la inhibición de la ciclooxigenasa plaquetar y que podría involucrar al calcio y a cambios en los receptores de TXA<sub>2</sub> a nivel de la membrana plaquetar. Por otra parte, según Hutton y cols. (1986) el etamsilato no produce ningún efecto en los estudios de agregación plaquetar inducida por ADP, adrenalina o colágeno ni sobre los niveles plasmáticos de plasminógeno, 2-antiplasmina ni fibronectina. Estos autores también concluyen que el etamsilato no actúa mediante la inhibición de la ciclooxigenasa plaquetar

ni previene la acetilación provocada en este enzima por la aspirina. Tampoco actuaría en la fibrinólisis ni sobre la fibronectina, sino que es más probable que inhiba la acción de prostaglandinas vasodilatadoras como  $\text{PGF}_2$  y  $\text{PGI}_2$ .

En efecto, investigaciones subsiguientes han podido demostrar que el etamsilato inhibe la síntesis de  $\text{PGI}_2$ , producto resultante de la transformación del AA en la pared vascular y que posee una potente acción vasodilatadora, antiadhesiva plaquetaria y antiagregante plaquetaria (Kovacs y Falkay 1981, Ment y cols. 1984). La inhibición de la síntesis de  $\text{PGI}_2$  facilitaría, por consiguiente, la adhesión plaquetaria, aumentando en último término la velocidad de formación del tapón hemostático primario.

Tal como ya enunciaron Okuma y cols. (1982) y Hutton y cols. (1986), parece ser que en el caso del etamsilato el mecanismo de inhibición de la síntesis de prostaglandinas no tiene lugar, como ocurre con la aspirina y otros AINEs, a nivel de la ciclooxigenasa, sino que actuaría en un siguiente paso a nivel de las enzimas **endoperóxido reductasa, endoperóxido isomerasa, prostaciclín sintetasa y tromboxano sintetasa**, dando lugar a una **reducción en la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  y  $\text{TXA}_2$**  respectivamente (Kovacs y Falkay 1981, Gard y Tigger 1990).

Como se ha comentado anteriormente, el  $\text{TXA}_2$  presenta un efecto completamente contrario al de la  $\text{PGI}_2$  en la fase de agregación plaquetar. El  $\text{TXA}_2$  es liberado por las plaquetas tras su activación, e induce la activación y agregación de otras plaquetas circundantes. Por tanto, el efecto competidor de la  $\text{PGI}_2$  y el  $\text{TXA}_2$  sólo tiene lugar en la fase de agregación. En condiciones normales existe un equilibrio entre los efectos de ambas sustancias que permite la localización del coágulo sanguíneo en la zona lesionada asegurando al mismo tiempo la fluidez normal de la sangre en el resto del vaso sanguíneo. Por lo tanto, la inhibición de la  $\text{PGI}_2$  por parte del etamsilato permitiría al  $\text{TXA}_2$  ejercer su acción vasoconstrictora e inductora de la agregación plaquetaria sin ningún tipo de limitante. Este fenómeno rompería el equilibrio antes mencionado, pudiendo perjudicar el

correcto desenlace de la hemostasia al contribuir a la posible formación de trombos. Sin embargo, se ha demostrado que **el etamsilato no es trombogénico** e incluso, según algunos autores, se podría considerar como un inhibidor de la hiperagregación plaquetar (Alvarez-Llano y cols. 1986, Lewis 1984). Así, las investigaciones de Kovacs y Falkay (1981), al confirmar que el etamsilato no sólo inhibe la biosíntesis de PGI<sub>2</sub>, sino también la de TXA<sub>2</sub>, permitiendo mantener el equilibrio entre ellos, permiten compatibilizar el modo de acción propuesto con la seguridad observada durante el uso clínico del etamsilato.

Hay que destacar que, en las conclusiones de los estudios mencionados, tiene una gran incidencia el método utilizado y las condiciones experimentales de cada estudio, no siempre bien descritas, y que podrían justificar el hecho de que algunos autores observen efecto del etamsilato sobre las plaquetas circulantes (Gökay y cols. 1966) y otros no (Raby y Coupier 1965, Cañadell 1966 y Cornet 1969). Asimismo, Sack y Dujvone (1973) no observaron contrarrestación del efecto del ácido salicílico sobre la hemostasia, mientras que Esteve y cols. (1960a) sí observaron dicho efecto. Por otra parte, tal como se describirá más adelante, algunos autores han observado efecto antihemorrágico del etamsilato en pacientes sanos mientras que otros sólo lo han podido comprobar en pacientes con algún tipo de coagulopatía.

A pesar de ello, actualmente parece demostrado que **el etamsilato ejerce su acción hemostática en la fase parietal del fenómeno de la hemostasia**, es decir, cuando se produce el contacto inicial y posterior interacción entre los vasos sanguíneos dañados con las plaquetas, antes de la posterior formación del tapón hemostático secundario o coágulo. Si bien la teoría de la inhibición de la PGI<sub>2</sub> es la que más ha sido investigada a lo largo de los años, las referencias bibliográficas publicadas en la década de los noventa remarcan el hecho de que el mecanismo de acción del etamsilato como hemostático aún no ha sido descrito con suficiente precisión (Daneshmend y cols 1989, Gard y Tigger 1990, Lyth y Booth 1990, Chamberlain y cols. 1991, Elbourne 1994 y EMEA 1998).

#### ***2.4.3.2 Aumento de la resistencia capilar o acción angioprotectora y disminución de la permeabilidad capilar:***

Se ha descrito que el etamsilato presenta una acción angioprotectora mediante la estabilización de las paredes vasculares (Raby y Coupier 1965). El etamsilato causaría la polimerización de uno de los componentes mayoritarios de la membrana basal de los capilares sanguíneos, el ácido hialurónico, confiriendo a dichos capilares una mayor integridad y resistencia (Hachen 1965, Thomas y cols. 1972). De este modo se ha descrito que previene la rotura espontánea de capilares en aquellos procesos patológicos que cursen con lesión o debilitación capilar (Raby y Coupier 1965, Cañadell 1966, Hachen 1965, Cailar y Roquefeuil 1967, Huguet y cols. 1969, Canal 1965, Cornet 1969, EMEA 1998). Junto a este fenómeno también se ha descrito su acción sobre la disminución de la permeabilidad capilar (Hachen 1965, Raby y Coupier 1965, Cañadell 1966, Deacock y Birley 1969, EMEA 1998).

Entre los trabajos más relevantes se encuentra el de Huguet y cols. (1969), que realizaron un estudio para determinar las acciones del etamsilato y comprobaron que ejercía una acción significativa sobre la resistencia capilar en el cobayo (mejoría del 50% medida por un capilodinamómetro de Lavollay). También se realizó un test de púpula intradérmica a la histamina en el que se administra azul de Evans IV y se controla el tiempo que tarda en aparecer el colorante en las pápulas formadas por la inyección intradérmica de histamina. Se observó que el etamsilato, administrado 1,5 horas previas a la administración de la histamina, reduce la permeabilidad vascular siendo este efecto duradero y proporcional a la dosis administrada (DE<sub>50</sub>: 125 mg/kg). En el cobayo escorbútico, en cambio, dosis de 500 mg/kg sólo consiguieron mejorías del 45%. En rata y cobayo se repitió la experiencia utilizando hialuronidasa y observando resultados similares (DE<sub>50</sub>: 200 mg/kg en rata y 80 mg/kg en cobayo). Este efecto fue también observado años más tarde en rata por Tarayre y Laouessergues (1975).

Huguet y cols. (1969) también evaluaron la influencia del etamsilato, administrado 90 minutos previos al test, sobre la presión de perfusión subcutánea en conejo y rata provocada por hialuronidasa. En rata se comprobó que este efecto es extremadamente duradero y proporcional a la dosis (DE<sub>50</sub> es de 160 mg/kg). Se comprobó también que el etamsilato no presenta acción antihistamínica, proadrenérgica, tensional ni vasoconstrictora. Por lo tanto, según los autores, el antagonismo a la acción de la histamina sólo pudo venir dado por sus acciones generales sobre la permeabilidad capilar. Los resultados de estas experiencias demuestran que el etamsilato tiene acción sobre la resistencia vascular y la permeabilidad. Al igual que años antes habían hecho Hachen en 1965 y Thomas y cols. (1972), los autores de este trabajo también proponen que **el etamsilato puede actuar reforzando la membrana basal de los capilares influyendo en el grado de polimerización del ácido hialurónico.**

#### *2.4.3.3 Actividad antiinflamatoria de etamsilato*

Dado que, tal como se ha descrito, se ha demostrado que el etamsilato reduce la síntesis de prostaglandinas, Gard y Tigger (1990) estudiaron la posible acción antiinflamatoria del etamsilato usando el test de inducción de edema en la pata de la rata por medio de carragenina.

Los resultados mostraron cierta acción antiinflamatoria del etamsilato con un efecto máximo similar al de la indometacina, aunque parece ser 25 veces menos potente. Para el estudio se emplearon ratas a las que se administró etamsilato, indometacina o substancia control y se calculó el volumen de edema. En todas las dosis de etamsilato se redujo el edema de forma significativa 1 h después de la administración de carragenina, siendo un efecto dosis-dependiente y alcanzándose el efecto máximo a los 250 mg/kg. Cuando se administraron conjuntamente etamsilato e indometacina no mostraron acción sinérgica, ni siquiera aditiva, lo que sugiere que su mecanismo de acción es diferente y no actúan de

igual modo sobre la cadena de la inflamación. La indometacina actúa por inhibición de la ciclooxigenasa; sin embargo, tal como se ha comentado, parece claro que el etamsilato no actúa sobre la ciclooxigenasa (Ment y cols. 1984, Chamberlain y cols. 1991). De este modo, por diferentes mecanismos, tanto la indometacina como el etamsilato inhibirían la síntesis de eicosanoides mediadores de inflamación, aunque con muy diferente potencia (Kovacs y Falkay 1981).

#### **2.4.4 Metabolismo, estudios de farmacocinética**

Los estudios de farmacocinética realizados con etamsilato no son tan numerosos como los que se han realizado para esclarecer sus acciones farmacológicas. No obstante, todos los estudios publicados tanto en la especie humana como en animales de laboratorio reflejan un comportamiento farmacocinético similar, es decir, ausencia de metabolización y rápida eliminación por vía renal en forma de etamsilato inalterado.

Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ningún estudio farmacocinético en la especie bovina ni se ha podido confirmar que su metabolismo y comportamiento farmacocinético siga los mismos parámetros que en las especies descritas a continuación. De hecho sólo se dispone de datos publicados en ratón, rata y conejo además del hombre.

##### **2.4.4.1 Distribución del etamsilato en el ratón:**

Marignan y cols. (1967) estudiaron la distribución corporal y paso transplacentario de etamsilato-C<sup>14</sup> en ratón hembra tras la administración IV, por medio del empleo de la técnica de la autorradiografía. Tras el análisis autorradiográfico se determinó que el proceso de **eliminación urinaria es rápido e inmediato**, observando la substancia radioactiva a nivel renal y vesical a los 10 y 20 minutos de la administración

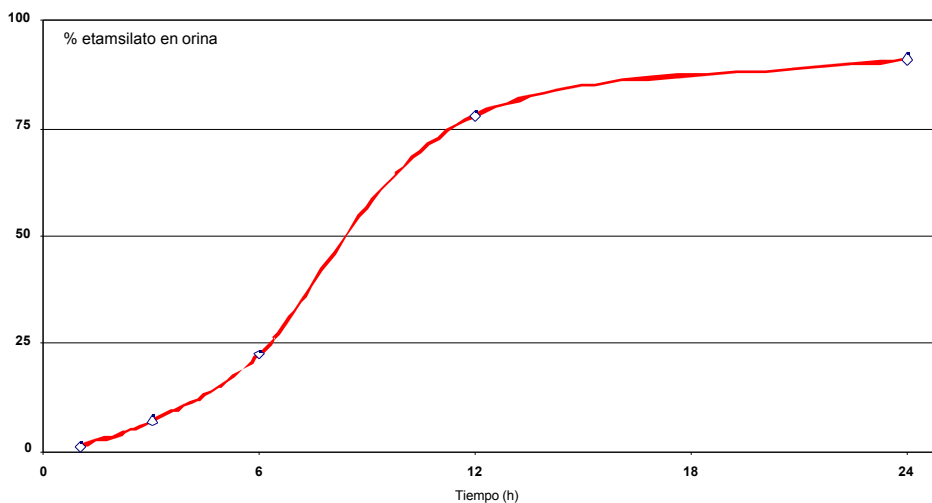
respectivamente. Existe también un proceso de **eliminación biliar** del producto que comienza a ser visible a los 30 minutos después de la inyección y persiste 2-3 h después. **El fármaco alcanza la placenta rápidamente** tras la inyección, al igual que otros órganos fuertemente irrigados. A los 10 minutos después de la inyección en los fetos se comienza a detectar el etamsilato, aunque en menor proporción que en el hígado y en la cavidad cardiaca de la madre. A las 4 horas después de la administración del producto, ya no se observa carga radioactiva en los fetos. En otros órganos la distribución es semejante, **a las 2 h tras su administración la radioactividad desaparece** y a las 4 h la eliminación del producto es total.

#### *2.4.4.2 Farmacocinética del etamsilato en rata:*

Yamboliev y cols. estudiaron en 1992 la absorción del etamsilato en ratas canuladas demostrando una baja absorción a nivel gástrico, mientras que **la absorción intestinal era rápida** ( $k_a$ :  $0,39 \pm 0,19$ ;  $T_{1/2a}$ :  $1,94 \pm 0,6$  h). Asimismo, en un modelo in vitro pudieron comprobar que, dado su carácter hidrófilo, el etamsilato **penetraba muy poco a través de las membranas** mostrando coeficientes de partición (lípidos-agua) muy bajos (inferiores a 0,1) a diferentes pH y en varios solventes orgánicos. Estos resultados concuerdan con que el etamsilato se encuentre principalmente en su forma ionizada a cualquier pH de la fase acuosa.

Esteve y Roser (1975) llevaron a cabo un estudio cualitativo y cuantitativo de la eliminación del etamsilato en orina, tras la administración oral en rata. Se emplearon 3 grupos de 10 ratas a las que se administraron 50, 250 o 500 mg de etamsilato/rata (300, 1500 o 300 mg/kg) y se recogieron muestras de orina durante 24h. A dosis orales de 50 mg/rata (300 mg/kg) se excretaba con la orina, al cabo de 24 horas, la casi totalidad de la cantidad administrada. El etamsilato se **excretó totalmente por orina** sin cambio apreciable, es decir **sin metabolización**.

**Figura 11. Excreción urinaria del etamsilato en rata tras la administración oral de una dosis de 300 mg/kg**



#### **2.4.4.3 Farmacocinética del etamsilato en conejo:**

Chanal y cols. (1969) realizaron un estudio farmacocinético en conejo tras la administración de 30 mg/kg de etamsilato marcado con C<sup>14</sup> por vía intravenosa. Se observó un descenso muy rápido de los niveles plasmáticos, de manera que a los 5 minutos tras la administración sólo se detectaba en sangre un 22-30% del producto administrado, al cabo de una hora el 6,5-11,5% y a las 2 horas tan sólo un 5-10%.

Tras analizar los resultados llegaron a la conclusión de que el producto **se elimina rápidamente** tras la administración IV y que a las dosis usadas (30-40 mg/kg) no se encontraron restos en sangre a las 4 h de la administración de etamsilato. Al igual que en el caso de la rata, la mayor parte, prácticamente en su totalidad, se eliminaba **con la orina de forma inalterada** (66-69% a las 12 h, y 79-93% a las 24h).



**2.4.4.4 Farmacocinética del etamsilato en hombre:**

En un estudio desarrollado por Martin (1983) 10 voluntarios sanos recibieron una dosis oral de 500 mg de etamsilato (dosis media administrada de 8,3 mg/kg). Tres de estos voluntarios recibieron posteriormente una dosis IV de 500 mg y otros tres la misma dosis vía IM. Se procedió a la recogida de muestras de sangre y orina a distintos intervalos de tiempo hasta las 72h tras la administración y se determinaron los niveles de etamsilato en plasma y orina.

Tal como se aprecia en las Figuras 12 y 13, tras la administración IV el perfil de la evolución de las concentraciones plasmáticas de etamsilato respecto al tiempo no permite apreciar una fase de distribución diferenciada de una fase de eliminación. Aparentemente el fármaco sufre una distribución muy discreta para luego eliminarse rápidamente, mostrando una **vida media de eliminación de entre 1,7 y 2,5 horas**. Por vía oral el descenso de los niveles plasmáticos fue más lento debido al retraso de la absorción del fármaco a nivel intestinal. El área bajo la curva (AUC) para la administración oral e IM fue muy similar a la obtenida para la vía IV, indicando que **la absorción fue prácticamente completa** (biodisponibilidad entorno al 100%).

**Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos del etamsilato en el hombre tras la administración de 500 mg de etamsilato por diferentes vías.**

Vía de administración	Tmax (h)	Cmax (µg/ml)	T <sub>1/2</sub> (h)	AUC (µg.h/ml)	F (%)
Oral	4	15,2	-	107,9	97,1
Intramuscular	1	30,5	2,1	127,7	114,9
Intravenosa	-	-	1,9	111,1	-

Martin no recoge en su informe el valor de Cl en el hombre, pero puede obtenerse a partir de la dosis administrada y del valor de AUC obtenido tras la administración IV:

$$Cl = Dosis / AUC_{0 \rightarrow \infty} = 8,3 / 111,1 = 0,074 \text{ L/h.kg}$$

Asimismo, se pudo calcular la constante de eliminación ( $k_{el}$ ) y, a partir de ella, el valor del Volumen de distribución (Vd):

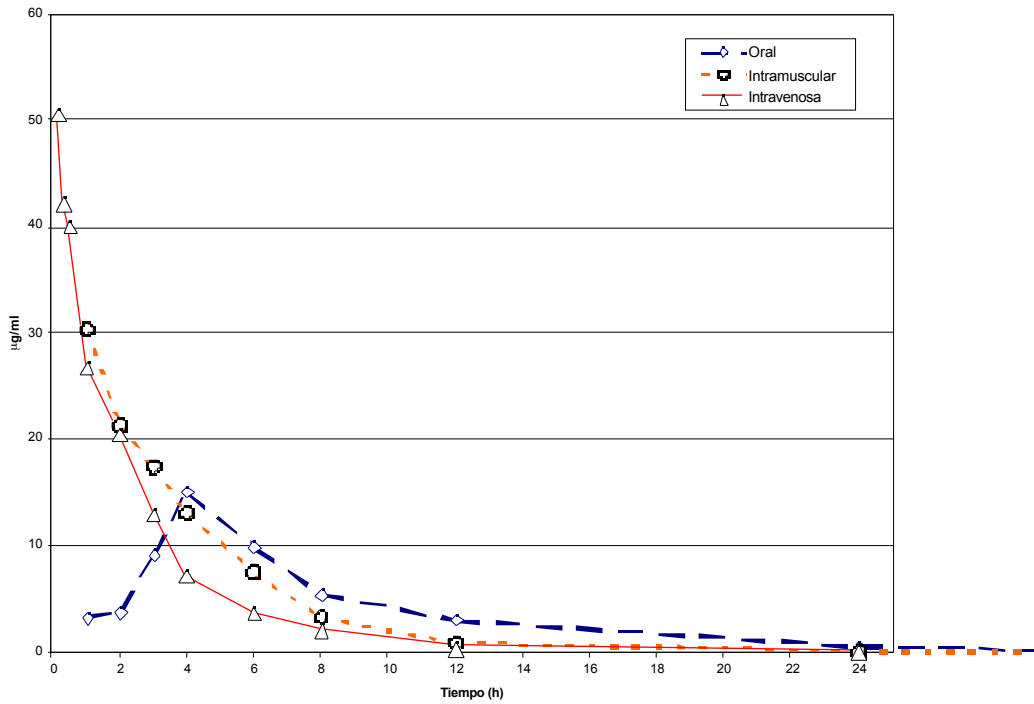
$$k_{el}=0,693/T_{1/2}=0,693/1,9=0,365 \text{ h}^{-1}$$
$$Vd= Dosis/(AUC_{0 \rightarrow \infty} \cdot k_{el})=8,3/(107,9 \cdot 0,365) =0,21 \text{ L/kg}$$

Vemos pues que se trata de un volumen de distribución bajo, que confirma una distribución limitada que se corresponde bien con el volumen del líquido extracelular en el hombre (Rowland y Tozer 1980a). Aunque sólo de modo aparente, este valor sería coherente con un fármaco poco liposoluble, por lo que distribuiría poco a tejidos, y que mostrara una débil unión a las proteínas plasmáticas (Martínez 1998b).

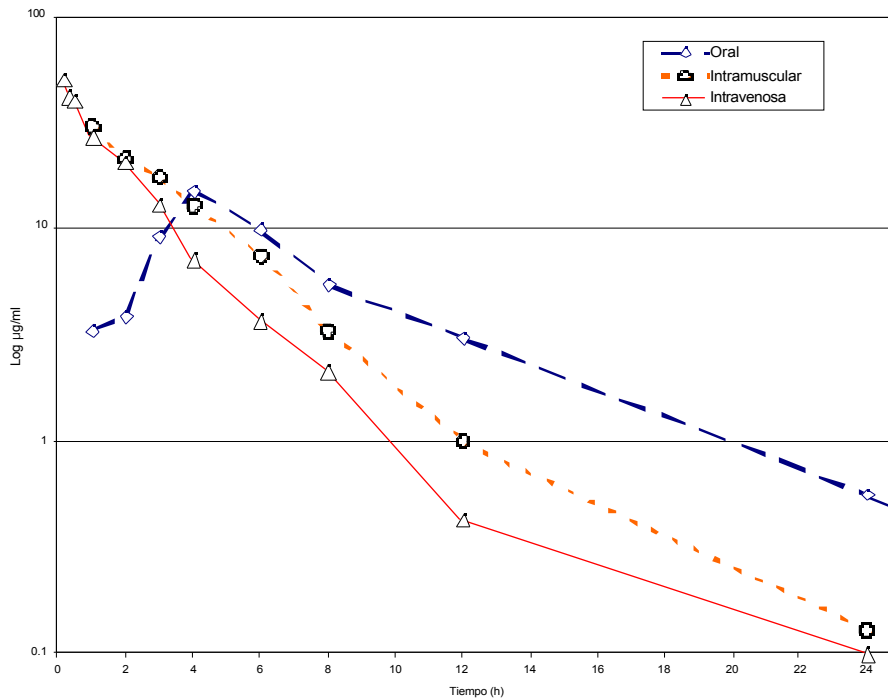
La excreción urinaria de etamsilato fue mayor al 80% de la dosis a las 72 h después de las administraciones IV e I.M., mientras que tras la administración oral se recuperó el 75%, lo cual confirma que la droga tiene una alta biodisponibilidad. Al igual que en las especies de laboratorio, no hubo evidencia de **ningún metabolito** en orina.

Por otra parte, tras la administración oral de 500 mg no consiguió alcanzar niveles plasmáticos o fetales adecuados en cinco mujeres parturientas (Reynolds 1989). Sin embargo, la misma dosis administrada por vía intramuscular a 7 madres consiguió dosis terapéuticas en el cordón umbilical, lo que puede ser de utilidad para la prevención “intraparto” de la hemorragia intraventricular en neonatos inmaduros (Harrison 1984).

**Figura 12. Farmacocinética del etamsilato en el hombre cuando se administra por diferentes vías (Martin 1983).**



**Figura 13. Farmacocinética del etamsilato en el hombre cuando se administra por diferentes vías. Escala semilogarítmica.**



(Martin 1983).

#### **2.4.5 Toxicidad y tolerancia**

El etamsilato se caracteriza por ser una molécula de **muy baja toxicidad y con un gran margen de tolerancia** (Esteve y cols. 1959, Esteve y cols. 1960a, Esteve y cols. 1960b, Tuchmann-Duplessis 1965, Lewis 1984, Chamberlain y cols. 1991, Chen 1993, EMEA 1998). Además, su extensa utilización tanto en medicina humana como veterinaria durante más de 30 años, así como la baja casuística de toxicidad o intolerancia debido a su utilización, confirman su buen perfil de seguridad. Sin embargo, no se ha descrito en la literatura científica ningún dato experimental que permita confirmar su buena tolerancia para muchas de sus especies de destino, ni tampoco para los bóvidos.

Según Esteve y cols. (1960a), administrado a dosis única, la  $DL_{50}$  por vía intravenosa es de aproximadamente 750-800 mg/kg en ratón y de 1350 mg/kg en rata. Por vía oral la  $DL_{50}$  es superior a 5000 y 10000 mg/kg respectivamente. El perro y gato toleran a la perfección dosis de 200 mg/kg. A dosis de 500-1000 mg/kg (50 veces superior a la terapéutica) provoca convulsiones y alteraciones tensionales pasajeras con recuperación total en pocos minutos.

Estudios a dosis repetida y de toxicidad crónica han confirmado la baja toxicidad del etamsilato siendo perfectamente tolerado a dosis de hasta 100 mg/kg administrada todos los días durante dos meses en cobayo, rata o perro. Debemos dar dosis 50 veces mayores a las administradas corrientemente en clínica, para que los animales de experimentación presenten signos de toxicidad aguda y tiene que llegarse a dosis 250 veces mayores para causar la muerte del animal, por lo que **puede considerarse un producto prácticamente inocuo** (Esteve y cols. 1960a).

Garvin y cols. (1967) llevaron a cabo un estudio de tolerancia en perros a los que se les administró por sonda dosis de 10 y 100 mg/kg durante 90 días (3 meses). Todos ellos presentaron un aspecto y comportamiento normales durante la experiencia y no se produjo ninguna muerte. A dosis tan altas como de 1000 mg/kg se observaron vómitos y salivación en todos los perros tras las administraciones de los primeros días. Sin embargo, no se observaron cambios en el peso corporal y el consumo de comida no sufrió variación alguna. Los estudios hematológicos (*recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos, hemoglobina, hematocrito y recuento diferencial*), de parámetros bioquímicos en sangre (*nitrógeno ureico sérico, glucosa sérica, fosfatasa alcalina sérica, AST, fibrinógeno, proteínas totales y componentes proteicos del suero y excreción de bromosulfaleina*) y parámetros indicadores de la coagulación (*tiempo de protrombina y tiempo de coagulación*), así como los análisis de orina, no pudieron revelar cambio alguno atribuible a la medicación con etamsilato a esta dosis. El recuento de plaquetas presentó cierta variación, si bien no se observaron diferencias respecto al grupo control. Las presiones arteriales sistólicas y diastólicas, presión arterial media y frecuencia cardíaca no mostraron variaciones a ninguna dosis respecto a los grupos control. La media de los pesos orgánicos fue similar en perros tratados y en controles. En cuanto al examen anatomopatológico no se apreciaron alteraciones macroscópicas o microscópicas en los perros tratados.

Dado que el etamsilato se utiliza frecuentemente en problemas obstétricos, es de interés saber su posible influencia en el desarrollo fetal o en las hembras gestantes. En este sentido, un completo estudio de teratogénesis llevado a cabo por Tuchmann-Duplessis (1963) sobre hembras preñadas de ratas Wistar, ratón Swiss albino y conejo se demuestra que el etamsilato es bien tolerado en estas tres especies. No se da mortalidad en las madres, la gestación evoluciona satisfactoriamente y el desarrollo fetal no sufre ningún tipo de perturbación. A dosis realmente elevadas de unas 35 veces superiores a la dosis terapéutica (300 mg/kg) no se observó aumento en el número de abortos o reabsorciones fetales. En las tres especies estudiadas el desarrollo fetal fue normal. Sobre

los 774 fetos de rata, 424 fetos de ratón y 202 fetos de conejo, no se encontraron anomalías macroscópicas detectables. Estos resultados permiten afirmar que el etamsilato también es un producto seguro en este aspecto.

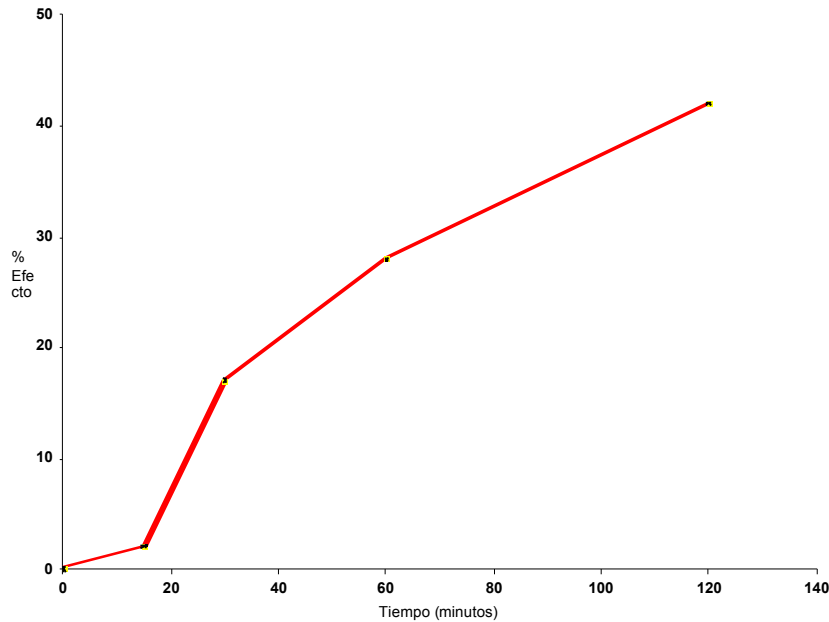
Por otra parte, existen estudios in vitro para determinar el potencial mutagénico del etamsilato realizados usando cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, y TA1538, con y sin activación metabólica. Usando diferentes concentraciones de etamsilato, en ningún caso se observó la aparición de mutagenicidad. (EMEA 1998).

No existe ningún dato de carcinogénesis respecto al etamsilato, no obstante el hecho de que no tenga potencial mutagénico hace pensar que tampoco será carcinogénico (EMEA 1998).

En el hombre se ha comprobado su alta tolerancia y que no afecta al mecanismo normal de la coagulación. Su administración no altera significativamente el tiempo de protrombina, fibrinolisis, cantidad o función plaquetaria, hemograma, fórmula leucocitaria, concentración de proteínas plasmáticas, fibrinógeno ni la presión arterial (Esteve y cols. 1959, Esteve y cols. 1960b, Lewis 1984, EMEA 1998, Chamberlain y cols. 1991, Chen 1993). No obstante, Esteve y cols. (1960b) y Esteve y cols. (1961) describieron un aumento del 18,4% en el número de plaquetas tras administrar 500 mg IM de etamsilato en 15 voluntarios, que en algún caso llegó a ser hasta del 50%. Los aumentos en el número de plaquetas llegaron a ser de 26% una hora tras la administración IV de 750 mg y del 42% a las dos horas (Figura 14). Sin embargo, estas diferencias no se detectarían transcurridas 24 h. Los autores proponen, dada la rapidez con que este fenómeno ocurre, que se debe a una movilización de trombocitos.

Las únicas referencias de signos de intolerancia en el hombre tan sólo describen la aparición de náuseas, cefaleas y irritación dérmica así como hipotensión transitoria tras la administración intravenosa (Reynolds 1989). Sin embargo, no constan los datos de la frecuencia de aparición de estas reacciones ni las dosis administradas.

**Figura 14. Aumento medio del número de plaquetas circulantes tras la administración intravenosa de 750 mg de etamsilato en pacientes humanos según Esteve y cols. 1961.**



#### **2.4.6 Eficacia clínica**

La evaluación del etamsilato como antihemorrágico para uso durante la cirugía presenta notables dificultades, puesto que la diversidad de intervenciones y de patologías genera una gran variabilidad en las pérdidas de sangre cuya medición dificulta mucho las pruebas clínicas utilizando pacientes reales (Deacock y Birley 1969). Por ello, muchos estudios han intentado utilizar métodos un tanto alejados de la práctica clínica habitual pero más objetivables tanto en animales como en el hombre, como la provocación de una hemorragia artificial estandarizada en unas condiciones rigurosas de reproducibilidad. A pesar de no existir una garantía de extrapolación de la eficacia demostrada siguiendo estos métodos a la cirugía real, la comparación de los resultados registrados entre los tratados y los no tratados permite determinar cuantitativa y objetivamente la influencia del hemostático. Sin embargo, ninguno de los estudios publicados hasta ahora ha sido realizado en la especie bovina.

A continuación se describen los estudios realizados en las especies animales y los más relevantes de los realizados en el hombre.

#### 2.4.6.1 Conejo

Ya en 1961 Laporte (Laporte 1961) demostró la influencia de diversas dosis de etamsilato sobre el TS según el método de Roskman modificado en la oreja del conejo. Los resultados fueron proporcionales a la dosis administrada y pueden observarse en la Tabla 8.

**Tabla 8. Acción del etamsilato sobre el TS en el conejo 1 h tras su administración. (Laporte 1961).**

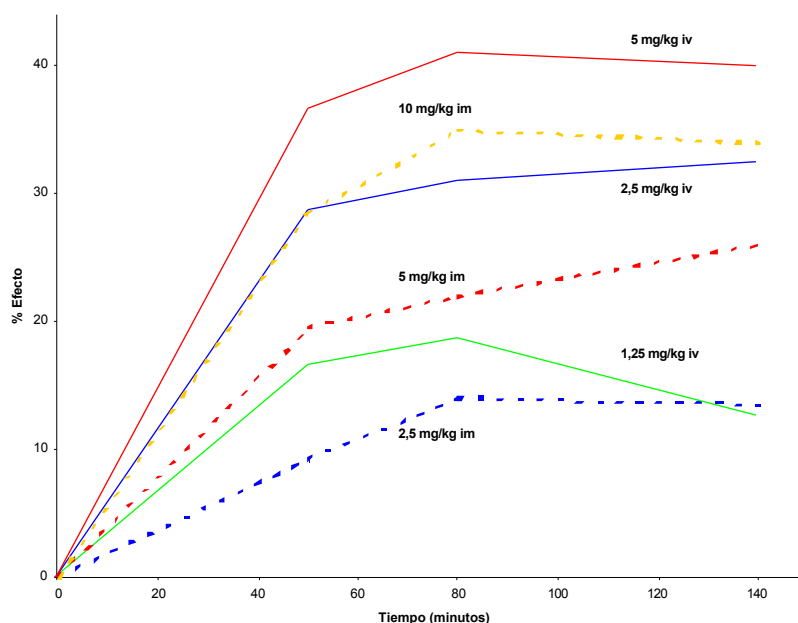
Dosis (mg/kg)	2	3	5	10	25
% reducción TS	-14,28	-33,44	-42,94	-47,33	-46,84

Laporte y Esteve (1967) usaron conejos albinos a los que se les practicó la determinación del TS siguiendo el mismo método que Laporte (1961). El etamsilato se administró tanto vía IV como IM a diferentes dosis. En una primera serie de ensayos se procedió a verificar la influencia de la vía de administración sobre los efectos obtenidos y en una segunda serie se estudiaron los efectos ejercidos por distintas dosis de etamsilato a diferentes tiempos tras su administración. Los resultados demostraron que el efecto conseguido tras la administración por vía IV el producto viene a resultar casi tres veces más activo durante la primera hora tras su administración, fenómeno que podría explicarse por las diferentes características farmacocinéticas de ambas vías al encontrarse todo el producto en sangre desde su aplicación IV mientras que la aplicación IM requiere un tiempo adicional para completar su absorción desde el punto de inyección.



Asimismo, se observa que los **efectos máximos obtenidos, tras su administración por cualquiera de las vías, no se alcanzan de manera inmediata, sino al cabo de 1-2 horas tras la administración del producto.** Los efectos no son proporcionales a los niveles de producto en sangre descritos (Chanal 1969) y pueden durar incluso varios días si la dosis administrada ha sido suficientemente elevada (160 a 320 mg/kg). Sin embargo, a ninguna dosis se sobrepasa el 40% de reducción del TS. Estos hechos concuerdan con la hipótesis de que los efectos del etamsilato sobre el TS del conejo no se ejercen directamente, sino que probablemente son la consecuencia de la activación o liberación de algún factor o factores que normalmente intervienen en el proceso de la hemostasia. Los autores describen la  $DE_{50}$  como 1,42 mg/kg (0,79-2,52) observando los efectos máximos a partir de dosis de 5 mg/kg.

**Figura 15. Curvas efecto/tiempo en conejo para distintas dosis de etamsilato (Según Laporte y Esteve 1967).**



Estos mismos autores ya determinaron unos años antes la acción antihemorrágica del etamsilato en conejos reflejada con el descenso en el TS al administrar esta molécula

tanto por vía intravenosa, como intramuscular, oral o rectal. Además, se vio un efecto dosis-dependiente. No obstante, al igual que en el presente estudio dosis-efecto, la disminución máxima del TS no sobrepasaba el valor del 40- 45% aunque se aumentara más la dosis (Esteve 1960a). En una publicación posterior (Esteve y cols. 1968) los mismos autores describieron las DE<sub>50</sub> para diferentes duraciones del efecto tras su administración por vía IV o IM (Tabla 9). En las primeras horas la vía IV es más eficaz, mientras que a partir de las 8h es la vía IM la que produce mayor inhibición del sangrado. Parece claro que este comportamiento obedece exclusivamente a razones farmacocinéticas.

**Tabla 9. Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) a tiempos distintos por las vías Intravenosa (IV) e Intramuscular (IM) según Esteve y cols. (1968) en conejo**

Tiempo (h)	Administración Intravenosa	Administración Intramuscular
1	1,42	4,20
4	1,85	1,28
8	3,82	3,80
24	71	19,5

#### 2.4.6.2 Cerdo

En esta especie es muy representativo el estudio realizado por Deacock y Birley (1969), en el que se determinó el efecto hemostático del etamsilato sobre una herida estándar. Este estudio se llevó a cabo de forma controlada (placebo), ciega y de forma cruzada utilizando 22 cerdos.

Sobre cada animal se realizó una prueba con aplicación de placebo y otra con etamsilato (25-50 mg/kg IV), sirviendo cada animal como su propio control. A los 40 minutos tras la administración se produjo una herida estándar (1,27 mm de profundidad y 7,6 cm de longitud y anchura), sobre la piel del animal anestesiado, por medio de un dermatomo

eléctrico que produjo una hemorragia capilar sobre la cual se valora la eficacia del etamsilato. La pérdida de sangre se estimó pesando los algodones empapados de sangre a los 10 minutos tras la provocación de la herida. El examen estadístico de los resultados indicó que el etamsilato era efectivo en una **reducción del sangrado del 25-50%** aproximadamente y que **el grado de reducción de la hemorragia era directamente proporcional a la severidad de la misma**, efecto que también observaron en el hombre Esteve y cols. (1959) y Cornet (1969).

Por otro lado no se observó ningún efecto sobre el pulso, la presión sanguínea o la cantidad de plaquetas en los animales, demostrándose de nuevo su excelente tolerancia.

#### **2.4.6.3 Perro**

Ment y cols. (1984) demostraron en perro Beagle que el etamsilato, al igual que en humanos (Chen 1993), es capaz de prevenir la aparición de hemorragia intraventricular en neonatos prematuros. Para ello llevaron a cabo un estudio en cachorros Beagles que fueron asignados de forma randomizada a grupos en los que se había dado etamsilato o solución salina como pretratamiento. Los niveles de prostaglandinas se obtuvieron previamente y 30 minutos después de la administración de estas soluciones y el flujo sanguíneo cerebral (CBF) se determinó por autorradiografía gracias a la utilización de iodoantipyrina-C<sup>14</sup>.

El etamsilato produjo un marcado **descenso en la incidencia de hemorragia intraventricular** que fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Los grupos pretratados con etamsilato sufrieron descensos significativos en los niveles de TXB<sub>2</sub> y 6-keto PGF<sub>1</sub> , productos derivados del TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>.

#### **2.4.6.4 Hombre**

El hombre es la especie en que mayor número de estudios clínicos se han llevado a cabo. Aunque los resultados no siempre han sido concluyentes, sí ha sido demostrado que el etamsilato reduce el sangrado de la herida estándar (Esteve y cols. 1959, Deacock y Birley 1969), y previene la hemorragia intraventricular en el recién nacido (Morgan y cols. 1981, Cooke y Morgan 1984, Benson y cols. 1986, Chen 1993). Sin embargo, hay estudios con resultados contradictorios en otro tipo de sangrados, como la reducción del sangrado tras la prostatectomía, demostrada por Symes y cols. en 1975 y no confirmada posteriormente por Towler y Valerio en 1978, ni por Lyth y Booth en 1990. Asimismo, la eficacia del etamsilato en la menorragia inducida por dispositivos intrauterinos en mujeres, fue demostrada por Jaffe en 1973, Harrison y Campbell en 1976 y Chamberlain y cols. en 1991, mientras que posteriormente Bonnar y Sheppard (1996) no consiguieron repetir los resultados.

De los numerosos estudios clínicos de etamsilato en el hombre publicados se resumen a continuación los más relevantes para la comprensión de la acción del etamsilato y su aplicación a la clínica del ganado vacuno.

Esteve y cols. realizaron ya en 1959 un estudio para determinar el descenso del tiempo de coagulación y del TS por el método de Duke, tras la administración de etamsilato por vía intravenosa (200 mg), intramuscular (200 y 400 mg), rectal (300 mg) y oral (600mg). Estas dosis equivalen aproximadamente entre 2,5 y 10 mg/kg. Los resultados se midieron una hora tras la administración del producto en el caso de la vía intramuscular o intravenosa, y a 2 ó 3 horas tras la vía oral y rectal.

Tras el análisis de los resultados se observó que, por cualquiera de las vías utilizadas, el etamsilato ejercía una **marcada reducción de los tiempos de coagulación y de sangría**, siendo más manifiesta sobre este último. A dosis de 200 mg IV o IM los

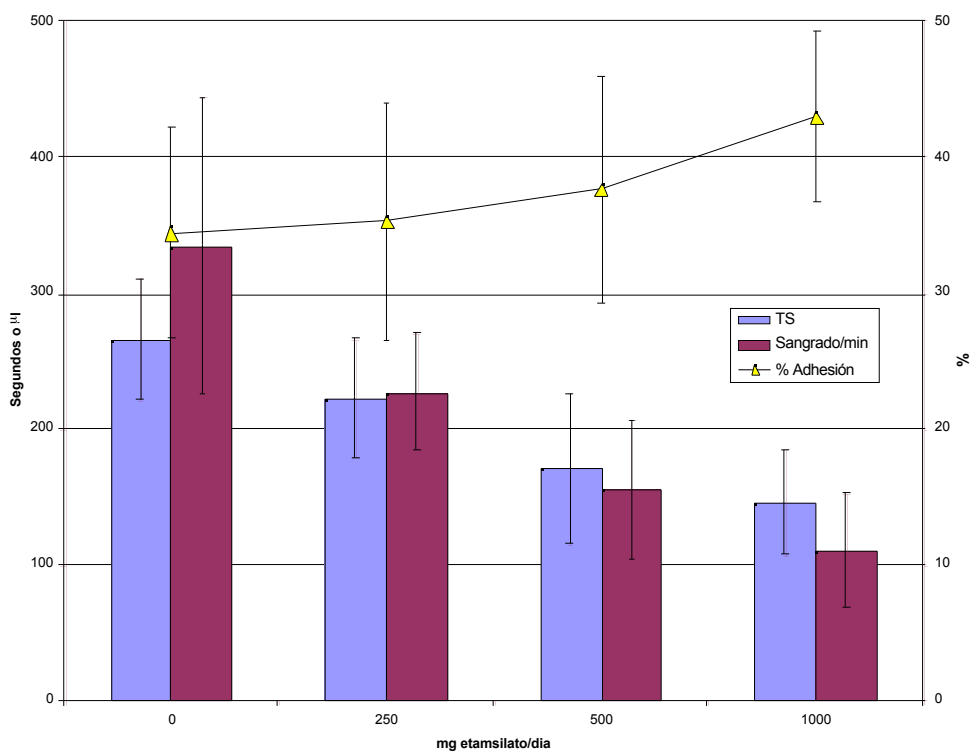
descensos del TS fueron del orden del 26% mientras que el Tiempo de coagulación descendió en un 16%. A dosis de 400 mg IM se observa una reducción del 48% del TS y del 44% del Tiempo de coagulación. Por la vía oral los efectos fueron más marcados a las 3 h, con descenso del 43% del TS y 39% del Tiempo de coagulación. Por la vía rectal se obtuvieron resultados similares aunque algo más bajos (32 y 14% respectivamente). Por otra parte, la disminución en el TS o en el tiempo de coagulación independientemente de la vía o dosis utilizadas **disminuía de manera directamente proporcional al valor previo** de los mismos, es decir, con etamsilato los valores inicialmente bajos de estos parámetros apenas se veían modificados, mientras que si estos valores eran altos la disminución en ellos era notable (hasta un 45%).

Canal (1964) realizó un estudio similar, comparando la acción del etamsilato con un placebo en 60 pacientes afectados de tuberculosis. Se trató de una prueba clínica a doble ciego, determinándose las modificaciones obtenidas en el TS según el método de Duke después de la administración del producto. El etamsilato se administró en forma de comprimidos (a razón de 1 comprimido de 250 mg cada 6 h durante 2 días, equivalente a unos 15 mg/kg y día), o bien, paralelamente, las mismas cantidades de comprimidos placebo en el otro grupo, determinándose el TS tres horas después de la administración del último comprimido. También se realizó el estudio tras la administración de dos dosis de 500mg (unos 15 mg/kg) por vía intramuscular (o el equivalente de placebo) determinándose el TS una hora después de la administración. Este estudio se realizó de forma cruzada en dos fases separadas por 10 días de período de blanqueo. Tras el análisis de los resultados se comprobó que el etamsilato reducía de forma significativa el TS, tanto para la formulación en forma de comprimidos como para la formulación IM, al compararlo con el efecto producido por el placebo. La reducción media fue del 33,8 y 32,9% respecto al TS previo, para la forma oral e intramuscular, mientras que el TS del placebo disminuyó tan sólo entre un 8,1 y un 4,5 % respectivamente.

En un estudio más actual y combinando criterios clínicos y farmacodinámicos, Vinazzer (1980) estudió el efecto del etamsilato en la reducción del sangrado (Método Sutor) y del TS a diferentes dosis, comprobando que la máxima reducción del TS ocurrió a la dosis máxima de 1000 mg/día (unos 15 mg/kg). Asimismo, se observó un **incremento de la adhesividad plaquetar in vivo e in vitro** (Método de Wright) (Figura 16).

Años más tarde, Kobrinsky y cols. (1991) demostraron que la administración conjunta de etamsilato y desmopresina produce un efecto sinérgico significativo en el hombre al disminuir el TS en pacientes con coagulopatías que no respondían, o respondían sólo parcialmente, a ambos agentes por separado. Asimismo, esta combinación también normalizó la homeostasis durante intervenciones odontológicas de diversa gravedad. Este hecho avala el paralelismo existente entre el TS y el sangrado intraoperatorio, por lo menos en determinado tipo de intervenciones. Los autores proponen que esta sinergia se debe a sus diferentes mecanismos de acción en que la desmopresina actuaría estimulando la liberación de FvW y el etamsilato inhibiría la producción de PGI<sub>2</sub>.

**Figura 16. Relación dosis-efecto del etamsilato en el TS, sangrado/min y porcentaje de adhesión plaquetar en el hombre (Vinazzer 1980)**



**Estos estudios (Esteve y cols. 1959, Canal 1964, y el posterior de Vinazzer en 1980) demostraron el efecto del etamsilato sobre la reducción del TS en el hombre a las 1-3 horas tras su administración, y en un grado proporcional a la dosis administrada (entre 2,5 y 15 mg/kg), pudiéndose alcanzar hasta porcentajes próximos al 45% en pacientes con el TS basal ya prolongado.**

Por otra parte, Raby y Coupier (1965) utilizaron 24 enfermos que presentaban una angiopatía aislada o asociada a una coagulopatía, y comprobaron que se obtenía la normalización de la resistencia vascular o una mejoría muy clara, dentro de la hora siguiente a la inyección intravenosa de 250-500 mg de etamsilato (unos 4-8 mg/kg). Para este estudio se utilizó la técnica de provocación de una púrpura experimental con el capilardinamómetro de Lavollay, para demostrar la acción del etamsilato sobre la resistencia parietal de los capilares. Estableciendo el llamado “Índice de Fragilidad Vascular” (IFV), este autor comprueba que este índice disminuye notablemente bajo la acción del etamsilato. Después de descartar que la modificación en el IFV no se debe a una acción vasoconstrictora del producto, ya que no se obtuvieron modificaciones de la tensión arterial o de la temperatura cutánea, Raby comprueba que la acción sobre la resistencia capilar no es fugaz, sino que persiste más de dos días, lo que a su juicio, es una prueba de la **acción del etamsilato sobre la fragilidad capilar**. Por otra parte estos autores afirman que no se detecta acortamiento alguno en el TS en animales o personas sanas tras una única administración de etamsilato, incluso si presentan TS previos ya alargados, lo que contradice frontalmente los resultados de Esteve y cols. (1959) y Canal (1964), así como los de otros estudios posteriores (Cornet 1969).

También Hachen (1965) estudió la influencia del etamsilato sobre la permeabilidad capilar a nivel cutáneo. En este caso la finalidad de su estudio fue probar el grado de actividad del etamsilato sobre la permeabilidad capilar tras la aplicación tópica de un hiperemiante. Se emplearon 20 pacientes a los que se administró etamsilato por

inyección subcutánea de 50 mg de producto en el mismo lugar que será tratado posteriormente por la pomada hiperemiante, o por inyección intramuscular de 500 mg del producto a distancia (músculo glúteo) del nivel cutáneo tratado. En ambos casos, tras la aplicación de la pomada hiperemiante los resultados demuestran que la administración local de este producto incluso a dosis muy bajas, permite obtener un efecto no despreciable sobre la gama de fenómenos inflamatorios locales (reducción de un 16,8% de la superficie edematosa). Su empleo en inyección IM de 500 mg (aproximadamente 8 mg/kg) da lugar a una auténtica inhibición de todos los signos locales (disminución de la reacción edematosa del 23,97%, disminución del prurito y reacción urticariforme) debidos a la previa administración de un agente hiperemiante. El autor propone el **uso de etamsilato frente a edemas localizados de tipo inflamatorio o alérgico que resultan de un aumento de la permeabilidad capilar.**

Otro estudio en el que se ve claramente la acción del etamsilato sobre la fragilidad capilar es el llevado a cabo por Canal (1965). Este autor utilizó como base el método empleado por Hachen, aunque algo modificado para obtener mayor precisión. Los resultados demostraron que una hora después de la administración IM de 1g de etamsilato (aproximadamente 16 mg/kg) o tres horas después de la última administración oral de 1g de etamsilato cada 4 horas conducían a una verdadera **disminución de todos los signos locales debidos a la aplicación de un agente hiperemiante tópico**, luego es igualmente eficaz por ambas vías de administración. El área de la superficie de eritema descendió en un 45,5 %, mientras que la intensidad de la rubefacción disminuyó en un 51% y la intensidad de prurito descendió en un 54%.

Asimismo Cañadell (1966) demostró la eficacia del etamsilato (a dosis de 25 mg/kg y día) en la **normalización de la resistencia capilar** en 49 pacientes diabéticos con fragilidad vascular aumentada (valorada según el IFV de Raby y Coupier 1965), seguida de una disminución en la incidencia de episodios hemorrágicos retinianos. También Cailar y



Roquefeuil (1967) estudiaron la influencia del etamsilato sobre la fragilidad capilar con buenos resultado tras la administración de una dosis de 500 mg.

Cornet (1969) estudió el TS, por el método de Duke, y el IFV, por medio de un capilardinamómetro, previamente y una hora tras una única administración de etamsilato (250 mg vía IV, equivalente aproximadamente a unos 4 mg/kg) en 100 pacientes, como parámetros útiles en la determinación de su eficacia como uso rutinario previamente a la cirugía. El resultado fue una disminución del TS en el 76% de los casos y en porcentajes mayores a mayor TS previo (del 15 al 50% de reducción). En un 87% de los casos en que el IFV basal estaba alterado se produjo alguna mejoría (mayor cuanto más alteración hubiera en un inicio). En un 86% de los casos se observó una mejora simultánea tanto en el IFV como el TS. Resultados similares fueron obtenidos con anterioridad por Louis y Paulus (1966) tras administrar 500 mg de etamsilato IV.

**Por lo tanto, tras los estudios de Raby y Coupier (1965), Hachen (1965), Canal (1965), Cañadell (1966), Cailar y Roquefeuil (1967), Louis y Paulus (1966) y Cornet (1969) parece confirmarse que el etamsilato, a dosis de entre 4 y 25 mg/kg produce un efecto beneficioso sobre la fragilidad capilar en el hombre.**

En un área de aplicación del etamsilato más directamente relacionada con la práctica clínica, se ha estudiado por diversos autores el efecto del etamsilato sobre diferentes procesos patológicos o bien como ayuda en diversos tipos de intervenciones quirúrgicas. A continuación se detallan algunos de los estudios más relevantes:

La hemorragia intraventricular (HIV) constituye uno de los mayores problemas para los neonatos prematuros, con una incidencia del 35-40% en neonatos de menos de 1,5 kg, que puede causar lesiones neurológicas graves o incluso la muerte. Por ello, Chen realizó en 1993 una prueba clínica para comprobar la eficacia del etamsilato como **prevención de la HIV** en estos pacientes. En esta prueba 171 neonatos prematuros (<1.751g)

recibieron 12 mg/kg de etamsilato en la primera hora de vida y posteriormente cada 6 horas durante 4 días (50 mg/kg y día) o bien recibieron placebo a igual pauta. Mediante ecoencefalogramas se evaluó la presencia y grado de hemorragia subependimal y se comprobó que la incidencia de hemorragia fue significativamente menor ( $P < 0,02$ ) en el grupo tratado con etamsilato (27,9% frente a 45,9% en el grupo control) al igual que la incidencia de hemorragias graves (10,5% frente a 23,5%;  $P < 0,05$ ). No se observaron efectos adversos atribuibles a etamsilato durante el estudio. Estos resultados confirman los obtenidos por Morgan y cols. (1981), Cooke y Morgan (1984) y Benson y cols. (1986). Sin embargo, estudios posteriores (Elbourne 1994, Sanghvi y cols. 1999) no pudieron confirmar la eficacia de etamsilato como profiláctico en esta indicación, posiblemente debido al excesivo tiempo transcurrido entre el nacimiento y administración del producto (hasta 4 horas).

Como ayuda a la prevención de hemorragias durante la cirugía, Lyth y Booth (1990) realizaron un estudio clínico a doble ciego en 44 pacientes para dilucidar la eficacia de etamsilato en el **control de la hemorragia en intervenciones de prostatectomía transuretral**. Cada paciente recibió un comprimido de 500 mg de etamsilato cada 6 horas desde 24 h antes de la intervención hasta 48h tras la misma (aproximadamente 30 mg/kg y día). Sin embargo, no se observó mejora alguna en la pérdida de sangre intraoperatoria o post operatoria con la administración de etamsilato. Estos resultados confirman los de otros investigadores que tampoco consiguieron demostrar la eficacia de etamsilato en este tipo de intervenciones (Towler y Valerio 1978) aunque contradicen los de Symes y cols. (1975) que sí observaron mejoría con la administración del etamsilato. Los autores sugieren que el desacuerdo puede provenir de la diferente técnica quirúrgica utilizada, puesto que la pequeña incisión realizada por Symes se beneficiaría en mayor grado de las propiedades del etamsilato, más eficaz en hemorragias de tipo capilar.

También se han realizado estudios sobre la capacidad del etamsilato de reducir las **pérdidas de sangre durante la menstruación**. Así, Chamberlain y cols. realizaron una prueba clínica (Chamberlain y cols. 1991) en la que controlaron a 34 mujeres con menorragia tratadas con etamsilato (500mg cada 6 horas, equivalente a 30 mg/kg y día aproximadamente) o ácido mefenámico (500mg cada 8 horas) durante todo el período de menstruación. Ambos productos mostraron una reducción estadísticamente significativa ( $P<0,01$ ) en la pérdida de sangre: 20% en el grupo etamsilato y 24% en el grupo de ácido mefenámico, pero no entre ellos ( $P=0,108$ ). Estos resultados confirman los previamente descritos por Jaffe (1973) y Harrison y Campbell (1976). Sin embargo Bonnar y Sheppard (1996) realizaron un estudio comparativo a dosis y protocolo similares con ácido mefenámico y ácido tranexámico en el que el etamsilato no redujo las pérdidas de sangre, mientras que el ácido mefenámico lo hizo en un 20% ( $P<0,001$ ) y el ácido tranexámico en un 54% ( $P<0,001$ ). Por otra parte, los autores mencionan un cierto riesgo de tromboembolismo para justificar el no uso rutinario, a nivel profiláctico, del ácido tranexámico en esta indicación.

Una de las patologías en que se ha intentado aplicar el etamsilato ha sido la de las **hemorragias gástricas** y, como modelo, las inducidas por la administración de aspirina. Como precedente Hutton y cols. (1986) observaron, en 12 pacientes, que la administración de 2g de etamsilato/día disminuye significativamente la prolongación del TS y la pérdida de sangre provocada por la administración de 600 mg de aspirina administrada 24 h antes, aunque no observaron ningún efecto en ausencia de aspirina. Anteriormente Sack y Dujvone (1973) no observaron contrarrestación del efecto del ácido salicílico sobre la hemostasia, mientras que sí que se observaron en el estudio de Esteve y cols. (1960a).

En un estudio más aplicativo, Daneshmend y cols. (1989) intentaron demostrar la eficacia del etamsilato en la reducción del sangrado gástrico inducido por la aspirina en pacientes sanos. Se administraron cuatro dosis diarias de 500 mg (unos 30 mg/kg) de

etamsilato simultáneamente a 600 mg de aspirina y se compararon con un grupo placebo y otro tratado con aspirina sola. Sin embargo, no se observaron diferencias en la pérdida de sangre a nivel gástrico en el grupo de aspirina sola o aspirina+etamsilato (en estudios anteriores sí se consiguió una reducción al administrar prostaglandinas). Es posible que esta falta de efecto del etamsilato comparado con otros estudios a nivel del TS se deba al diferente mecanismo hemostático a nivel gástrico comparado con la piel, que según Whittle y cols. (1986), sería independiente del fenómeno de la agregación plaquetar.

De los estudios descritos se deduce que existe una cierta incertidumbre en cuanto a la utilidad de la administración de etamsilato en la clínica habitual. Posiblemente, el desacuerdo existente entre los diversos autores se deba a pequeñas diferencias en el modelo experimental utilizado, puesto que si utilizando modelos más o menos estándar, como la determinación del TS, ya se observa la influencia de numerosos factores que afectan grandemente a la variabilidad y, por tanto, a la repetibilidad de los resultados, más difícil es encontrar situaciones homogéneas en el sangrado de situaciones clínicas reales. Así, además de tener que asumir la variabilidad inherente a las diferentes dosis administradas, tiempos de determinación de los resultados, subjetividad de la interpretación de los mismos, etc., hay que añadir la diversa situación clínica de los pacientes y la variabilidad en las intervenciones realizadas o patologías tratadas. Debido a ello, se hace difícil distinguir si, a lo largo de la experimentación con el producto, se ha podido concluir erróneamente que el etamsilato no es eficaz en determinados procesos por sí mismo o bien no ha podido demostrarse su eficacia por defectos en algunos diseños experimentales utilizados.