

## **Capítulo 3**

# **OBJETIVOS**



### **3 OBJETIVOS**

El objetivo principal de esta investigación fue el estudiar la eficacia y la seguridad del empleo del etamsilato en la clínica de vacuno. Para ello se diseñaron tres estudios, cada uno de ellos con sus objetivos específicos.

1. El primer trabajo consistió en el estudio farmacocinético básico del etamsilato en la especie bovina. El objetivo principal de este estudio fue determinar el comportamiento del etamsilato en el torrente sanguíneo en esta especie, caracterizando el perfil farmacocinético del fármaco tras la administración de una dosis media dentro del rango de dosis recomendadas por la vía intravenosa (IV) así como la vía intramuscular (IM).
2. En el segundo de los trabajos se estudió la tolerancia sistémica del etamsilato administrado en vacuno a dosis y pauta equivalente al doble de la máxima recomendada como terapéutica. El estudio se diseñó con el objetivo de detectar cualquier anomalía que la administración de etamsilato pudiera provocar en bóvidos y describir un margen terapéutico mínimo que permitiera el uso clínico seguro del etamsilato. Adicionalmente, también se estudió la tolerancia local del etamsilato a nivel del punto de inoculación al ser

administrado en vacuno a la dosis terapéutica por vía intramuscular.

3. El tercer estudio tuvo como objetivo la confirmación de la eficacia del etamsilato como antihemorrágico en vacuno. Para evidenciar más fácilmente su eficacia, se escogió la dosis terapéutica más alta de las recomendadas en la práctica clínica y se estudió su influencia sobre el Tiempo de Sangría (TS) en esta especie. Asimismo, también se comprobaron las posibles modificaciones que el etamsilato pudiera inducir en los tiempos de coagulación o en el recuento de plaquetas en bóvidos.

Con los resultados provenientes de los tres estudios se pretendió comprobar la idoneidad de la dosis terapéutica utilizada habitualmente y sentar las bases para el futuro desarrollo de una pauta óptima de administración del etamsilato en vacuno, detectando sus posibles efectos adversos o colaterales, así como confirmando su eficacia como antihemorrágico en la especie bovina. Esta información debería permitir el uso del etamsilato en la clínica de vacuno sobre la base de criterios científicos y comprobados experimentalmente.

## **Capítulo 4**

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4 MATERIAL Y MÉTODOS**

De todo lo expuesto anteriormente sobre el etamsilato, puede deducirse con bastante seguridad que el etamsilato es un fármaco prácticamente inocuo. Al menos, se ha podido comprobar que existe un margen de seguridad muy amplio tanto en los estudios de toxicología como en la experiencia clínica tanto en veterinaria como, sobre todo, en humana. Por lo tanto no parece necesario guardar una especial prevención en cuanto a la cantidad de fármaco administrada en la experimentación en bovinos. La prueba de tolerancia del etamsilato en esta especie debería confirmar la buena tolerancia observada en el resto de especies estudiadas.

Desde el punto de vista farmacocinético, en todas las especies estudiadas parece demostrado que el etamsilato se absorbe muy bien por cualquier vía de administración. Su distribución tisular es limitada debido a su baja liposolubilidad al tratarse de un compuesto muy poco polar, por lo que su acción se limita prácticamente a la sangre y vasos sanguíneos. La eliminación del etamsilato es rápida ( $T_{1/2}$  de entre una y dos horas) y se realiza por vía renal sin previo metabolismo. Por otra parte, las curvas de concentración sanguínea tras administración IV en relación con el efecto conseguido, muestran que cuando el efecto es máximo las concentraciones de fármaco en sangre son ya muy bajas. Dada la similitud en el comportamiento farmacocinético en todas las

especies estudiadas, los tiempos óptimos para la determinación del TS tras la administración del etamsilato en bóvidos no parece que deban variar respecto a los estudiados en otras especies. Sin embargo, el comportamiento del etamsilato en esta especie deberá confirmarse en el correspondiente estudio farmacocinético.

En cuanto a las posibilidades existentes en cuanto a modelos experimentales para demostración de la eficacia del etamsilato como hemostático en bóvidos hay que tener en cuenta los antecedentes en las especies de laboratorio y en el hombre. Así, se han revisado numerosos estudios que tratan de dilucidar un todavía oscuro mecanismo de acción del etamsilato, bien como favorecedor de la hemostasia primaria o bien como estabilizador de los vasos sanguíneos. También se han descrito numerosos estudios clínicos frente a diferentes situaciones clínicas en humanos. En la especie bovina lo que se debe demostrar es la eficacia del etamsilato frente al sangrado en intervenciones quirúrgicas o intervenciones obstétricas, que es lo indicado en el producto comercial (Hemo 141)<sup>iv</sup> y el uso que actualmente se hace de este producto en el campo. Idealmente se debería utilizar un tipo de intervención quirúrgica más o menos estándar, sin embargo esto se enfrenta a dos tipos de dificultades prácticamente insalvables: En primer lugar ya se han descrito las dificultades de demostración de la eficacia de los hemostáticos frente a situaciones clínicas reales debido a las numerosas variables no controladas. Si esto se produce en pacientes humanos tratados en hospitales, sería mucho más difícil controlar todas las posibles situaciones en circunstancias de campo donde se ejerce primordialmente la clínica de bovino. En segundo lugar, cualquiera que fuera el tipo de intervención escogido sería muy difícil, en las condiciones actuales de la práctica veterinaria en bovino, encontrar una casuística suficiente en un intervalo de tiempo razonable.

Por lo tanto, por lo menos en una fase inicial, hay que recurrir a un modelo experimental en que se pueda controlar el máximo de variables. De los modelos descritos anteriormente destaca, sin lugar a dudas, la reducción en el TS. Este ha sido el test que ha

dado resultados más concluyentes tanto en especies de laboratorio como en el hombre, en casi todos los estudios realizados. Si bien la determinación del TS no está estandarizada en bovino, es fácilmente aplicable a esta especie y a las dosis y pautas adecuadas debería ser una prueba útil para demostrar la eficacia del etamsilato en esta especie.

Para la determinación de la dosis a utilizar para el estudio de eficacia y, que también condicionará las dosis a utilizar en los estudios de tolerancia y de farmacocinética, hay que basarse en los estudios realizados en otras especies. De todo lo revisado respecto al etamsilato y el TS se puede concluir que el etamsilato ejerce un efecto (reducción del TS), que parece ser directamente proporcional a la dosis administrada, hasta alcanzar un efecto máximo. Dicho efecto, en el caso del conejo y con el modelo experimental utilizado en los distintos trabajos consultados, es de aproximadamente un 40% de reducción del tiempo de sangrado y se consigue con una dosis de entre 5 y 10 mg/kg (IV) (Laporte y Esteve 1967, Esteve 1960a). Estos resultados (hasta un 45% de reducción del TS) fueron también confirmados en el hombre a dosis de entre 2,5 y 15 mg/kg (Esteve y cols. 1959, Canal 1964, Vinazzer 1980).

En general, el efecto máximo se consigue tras la administración de 10 mg/kg y tras la administración de dosis superiores, aunque pueda obtenerse una mayor reducción del TS, no se produce un aumento claro y significativo del efecto. A pesar de ello, a dosis superiores se observa una tendencia de dichos efectos a permanecer más tiempo en función de la dosis: a dosis más elevadas, mayor duración del efecto.

El efecto del etamsilato sobre el TS no es inmediato, incluso tras su administración IV el efecto máximo no aparece hasta al cabo de 1 o 2 horas, aunque a los 30 minutos ya se observa cierto efecto que algunos autores han considerado como relevante. En general en los estudios sobre la reducción del TS, éste se ha determinado entre 1 y 3 horas tras la administración del etamsilato, observándose casi siempre una marcada reducción.

La duración del efecto tras la administración intravenosa de etamsilato es relativamente corta. El efecto máximo de una dosis de 5 a 10 mg/kg dura aproximadamente unas 4 horas y a continuación disminuye con rapidez. A estas dosis el efecto disminuye por debajo de la mitad del efecto máximo, es decir, por debajo del 20% de reducción del TS aproximadamente entre las 8 y 9 h.

Sobre la base de lo comentado y extrapolando estos resultados de otras especies animales, la pauta lógica a seguir al utilizar la vía intravenosa sería de una dosis de entre 5-10 mg/kg cada 6-7 h. Administrando dosis superiores podría ampliarse ligeramente el intervalo entre dosis y, por la vía intramuscular podría quizás dosificarse a intervalos de hasta 12 horas (2 veces al día). Con esta pauta se garantizaría, durante el tratamiento, la permanencia de un efecto de como mínimo la mitad del efecto máximo alcanzable.

En base a lo anteriormente expuesto, el intervalo de dosis a recomendar en bóvidos podría ser de entre 5 y 15 mg/kg. Con una frecuencia de cada 12 horas en administración IM y de menores intervalos para la administración IV.

Por otra parte, las dosis recomendadas en humanos como angioprotector van de 4 a 6 comprimidos de 250 mg/día y como hemostático de 2 a 8 comprimidos diarios (HEMO 141<sup>vi</sup>, DICYNONE 250<sup>v</sup>) Estas dosis equivalen a entre 7,5 y 30 mg/kg y día. Como antihemorrágico se recomienda una dosis de ataque por vía intramuscular o intravenosa de 1g (unos 15 mg/kg) seguido de 500 mg cada 4 a 6 horas (30-45 mg/día). En niños la dosis ha sido de 250 a 750 mg por vía parenteral seguida de 250 mg por vía oral o parenteral cada 4 a 6 horas. En neonatos se usa a 12,5 mg/kg cada 6h por vía intramuscular o intravenosa (Reynolds 1989).

---

<sup>v</sup> DICYNONE 250 Prospecto del producto. Laboratoires Synthelabo France. 1992

En caso de bóvidos la dosis utilizada comercialmente (Hemo 141)<sup>iv</sup> es de 5-7,5 mg/kg p.v. Si se administra para la prevención de hemorragias se da una dosis única entre 15-30 minutos antes de la intervención quirúrgica. Si se administra en el tratamiento de hemorragias se deberá repetir cada 4-6 horas a mitad de dosis, hasta solucionar el problema. En otras especies animales (óvidos, cápridos, perros y gatos) se recomiendan dosis de entre 6,25 y 12,5 mg/kg sin justificación científica aparente, salvo la facilidad de dosificación del producto comercial en base a los mililitros a administrar por kilo de peso del animal: 1ml/10 o 20 kg en especies pequeñas y 1 ml/15-25 kg en especies de mayor tamaño (bóvidos y équidos).

Por lo tanto, para asegurar que se obtienen resultados, se utilizará **la dosis máxima** de las recomendadas en la clínica administrada **2 h antes de la determinación del TS** y que se establece en **12,5 mg/kg**. Para demostrar el buen margen de seguridad de esta dosis se utilizará el doble de la misma (**25 mg/kg para el estudio de tolerancia**, en que se administrará de forma repetida durante varios días (aproximadamente también el doble del máximo de días en que se utilizaría el producto en la práctica clínica habitual). Para evitar cualquier interferencia debida a la absorción del producto, en ambos estudios se utilizará la vía intravenosa.

Finalmente, para el estudio de farmacocinética se ha escogido una dosis que pudiera ser representativa de todo el margen de dosis que se pueden utilizar en la práctica, por ello se ha escogido una **dosis intermedia** entre el rango más habitual de dosis, quedando fijada a **7,5 mg/kg**.

#### **4.1 FARMACOCINÉTICA**

##### **ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DEL ETAMSILATO EN BÓVIDOS TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA E INTRAMUSCULAR A DOSIS ÚNICA**

El propósito de este estudio fue el describir las características farmacocinéticas básicas del etamsilato en la especie bovina. Para ello se utilizó una dosis única por vía IV y se comparó con la administración de la misma dosis por vía IM como vía alternativa de administración. Se siguió un diseño cruzado en el cual ambas vías de administración se probaron en los mismos animales y, con los niveles plasmáticos obtenidos a diferentes tiempos tras la administración de etamsilato, se calcularon los principales parámetros farmacocinéticos propios de cada vía de administración. El estudio se llevó a cabo cumpliendo las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (Real Decreto 822/1993, OECD 1982) y las directrices recomendadas por la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA) para estudios de farmacocinética (EMA 2000).

#### **4.1.1 Animales**

Se utilizaron 6 terneros, 3 machos y 3 hembras de raza frisona, de peso basal comprendido entre 162 y 202 kg y edad aproximada de cuatro meses. Los animales se sometieron a un período de aclimatación de 5 días, entre la llegada y el inicio del trabajo experimental, en los que se mantuvieron en las mismas condiciones del estudio. Cada animal fue identificado mediante un crotal en la oreja y alojado en boxes individuales de unos 8 m<sup>2</sup>, durante los períodos de aclimatación y de ensayo.

Durante estos períodos los animales dispusieron de pienso y agua *ad libitum*, excepto en el día de administración de los productos en que los animales estuvieron 16 horas en ayunas antes de recibir el tratamiento y no se les volvió a suministrar el pienso hasta transcurridas 8 horas desde la administración. Con ello se pretendía evitar posibles interferencias analíticas por la presencia de metabolitos en el plasma.

Previamente al inicio de la fase experimental se realizó un análisis hematólogico y bioquímico a todos los animales (hemograma completo, albúmina, creatinina, ALP, GGT, AST, CK, GLDH, Na/K, proteínas séricas, glucosa y urea), a fin de confirmar el estado fisiológico normal de los animales. Todos los animales se pesaron 24 horas antes del inicio de cada fase de administración para ajustar la dosis administrada al peso exacto del animal.

#### **4.1.2 Producto**

Se administró etamsilato, por vía intravenosa y por vía intramuscular a la dosis de 7,5 mg/kg de etamsilato (equivalente a 0,6 ml/kg de la especialidad comercial utilizada<sup>vi</sup>). Se

---

<sup>vi</sup> HEMO<sup>®</sup> 141 Laboratorios Dr. Esteve S.A. Barcelona

eligió esta dosis por corresponder a la dosis media recomendada como terapéutica y, por tanto, ser la más representativa del comportamiento del producto en su uso clínico.

#### ***4.1.3 Protocolo del estudio***

El estudio se realizó de forma cruzada en dos fases (I y II), de manera que cada animal recibió etamsilato por ambas vías de administración, bien en la fase I o en la fase II. El orden de asignación de los animales a cada fase se realizó al azar, quedando un diseño cruzado completo y equilibrado, muy adecuado para estudios de biodisponibilidad (Gich 1990). Entre ambas fases del estudio se dejó un intervalo de 5 días como período de “blanqueo”. Dada la rápida eliminación del producto, evidenciada en especies de laboratorio así como en el hombre, este período se consideró más que suficiente para que no existieran interferencias entre las dos administraciones (efecto “carry-over”). Esta condición se cumpliría, al menos a nivel teórico, si este intervalo fuera superior a 10 semividas de eliminación (Gich 1990).

**Tabla 10. Esquema del diseño cruzado de la administración del producto**

<b>ANIMAL N°</b>	<b>SEXO</b>	<b>Peso basal (kg)</b>	<b>FASE I</b>	<b>FASE II</b>
1	H	202	IM	IV
2	H	196	IV	IM
3	H	195	IM	IV
4	M	162	IV	IM
5	M	177	IM	IV
6	M	176	IV	IM

\* IV: Vía intravenosa, IM: Vía intramuscular; H: Hembra; M: Macho.

##### ***4.1.3.1 Administración del producto***

El producto se administró por las vías y dosis indicados anteriormente de la siguiente forma:

- VIA INTRAVENOSA (IV): Antes de la administración del producto y una vez rasurada la zona y desinfectada con una solución de povidona yodada, se puso un catéter en la yugular fijándolo con hilo de seda. El producto se administró a través del mismo y a continuación se administró 1 ml de suero fisiológico estéril, a fin de asegurar que la totalidad del producto se había incorporado directamente a la sangre.
- VIA INTRAMUSCULAR (IM): Se administró el producto en la región cervical media (músculo trapecio). Se eligió esta localización por ser la comúnmente utilizada en la clínica de vacuno.

#### **4.1.3.2 Toma de muestras**

Las muestras de sangre (5 ml) se extrajeron de la vena yugular por venocentesis mediante vacutainer. La vena utilizada para la extracción de las muestras obtenidas tras la administración intravenosa fue siempre la contraria a la administración del producto.

Para facilitar la comparación de los resultados tras la administración por vía IM o IV, las extracciones se realizaron a los mismos tiempos, con la excepción de la extracción de los 5 minutos. Esta extracción no se realizó en la vía IM por considerar que los valores obtenidos serían todavía indetectables, mientras que tras la administración IV ayudaría a definir las fases iniciales de distribución del producto, esenciales para evitar errores en los cálculos de depuración y en la evaluación de las dosis apropiadas (Benet y cols. 1996). En total se extrajeron 15 muestras en el estudio por vía IV y 14 tras la administración IM, cantidad superior al mínimo recomendado para este tipo de estudios y, si la elección de los tiempos es acertada, debería permitir la adecuada descripción de las características cinéticas del fármaco (Gich 1990).

**Tabla 11. Tiempos de extracción de sangre**

Tras la administración <u>intravenosa</u>														
Basal	5 min	10 min	20 min	30 min	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
Tras la administración <u>intramuscular</u>														
Basal	--	10 min	20 min	30 min	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h

#### **4.1.3.3 *Procesamiento de las muestras***

La sangre se recogió en tubos con heparina y se centrifugó a 3000 rpm (1520 g) durante 10 minutos. El plasma resultante se congeló entre -20°C y -30°C hasta su análisis para la determinación del contenido de etamsilato.

#### **4.1.3.4 *Análisis de las muestras***

Para la determinación del etamsilato en plasma se desarrolló un método analítico utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El método consta de una extracción líquido-líquido en medio ácido y metanol y una detección mediante fluorescencia (longitud de onda excitación 301 nm; longitud de onda emisión 345 nm). Se utilizó dietilamina persilato como estándar interno y una columna cromatográfica Ultrasphere ODS (Beckman).

El método fue validado en plasma de ternero utilizando concentraciones de entre 0,025 y 50 µg/ml para la curva de calibración, de manera que se obtuvo un límite de cuantificación de

0,05 µg /ml y una precisión con Coeficientes de Variación inferiores al 15% a las concentraciones más bajas e inferiores al 3% en las más altas.

#### 4.1.4 Tratamiento de los datos

##### 4.1.4.1 Parámetros

A partir de los datos individuales de niveles plasmáticos de etamsilato se estimaron los siguientes parámetros:

- La vida media de eliminación ( $T_{1/2}$ ): Es la expresión del tiempo necesario para que la concentración en plasma se reduzca a la mitad durante la fase de eliminación (Baggot 1995). Se estima a partir de la pendiente del segmento terminal de la curva del logaritmo de la concentración plasmática en función del tiempo ( $t$ ), calculada por regresión lineal.

Matemáticamente se expresa como:  $T_{1/2} = \ln 2 / -k$  o también  $T_{1/2} = \ln 2 \cdot Vd / Cl$ . Al ser un parámetro mixto es poco válido para medir variaciones en la eliminación de los fármacos, puesto que a menudo, en casos de cinética no lineal, los cambios simultáneos en la velocidad de eliminación y en la distribución tisular tienden a anular su efecto sobre la  $T_{1/2}$  (Martínez 1998b, Martínez 1998c).

- El área bajo la curva concentración-tiempo, (AUC) de 0 a  $t$  y extrapolada de 0 a  $\infty$ , calculada mediante el método log-trapezoidal. Este parámetro, representa el valor del área que delimita la curva de niveles plasmáticos de un fármaco en función del tiempo ( $AUC = \int_0^t C \cdot dt$ ). Sirve para definir el grado de absorción del producto y calcular la biodisponibilidad (F) de otras vías de administración

respecto a la intravenosa y es equivalente al momento estadístico de orden cero<sup>vii</sup> (Domenech 1990, Martínez 1998a).

- Biodisponibilidad (F): Es el porcentaje de fármaco que, desde su lugar de administración, alcanza la circulación sanguínea. Se calcula mediante la comparación de la  $AUC_0$  de la administración extravasal respecto a la administración IV ( $F = AUC_0 \text{ IM} / AUC_0 \text{ IV}$ ).
- El tiempo medio de residencia, (MRT): Es la media aritmética del tiempo que cada molécula de fármaco permanece dentro del organismo. Incluye la absorción, distribución y eliminación y constituye el momento estadístico de orden uno<sup>vii</sup> (Domenech 1990, Martínez 1998a) ( $MRT = \int_0^{\infty} t C dt / \int_0^{\infty} C dt = AUMC_0 / AUC_0$ ).
- El área bajo la curva del momento concentración-tiempo AUMC: Este parámetro, representa el valor del área que delimita la curva que representa el producto de los niveles plasmáticos por el tiempo al que se obtienen en función del tiempo ( $AUMC = \int_0^{\infty} t C dt$ ). Su principal utilidad es la de calcular el MRT, sin tener por sí misma una interpretación fisiológica evidente (Martínez 1998a). Al igual que el AUC, se calcula mediante el método log-trapezoidal.
- El tiempo medio de absorción (MAT): Es el tiempo medio de residencia del fármaco en el tejido donde es administrado, representando el tiempo necesario para que se realicen los procesos de disolución y absorción tras una administración extravasal. (Domenech 1990, Martínez 1998a). Se calcula mediante la fórmula:  $MAT = MRT_{im} - MRT_{iv}$ .

---

<sup>vii</sup> La teoría de los momentos estadísticos en farmacocinética se basa en la asunción de que el movimiento individual de las moléculas de fármaco a través del organismo puede considerarse gobernada por la probabilidad y que sus concentraciones plasmáticas en función del tiempo siguen una distribución normal (Domenech 1990)

- Los valores de  $C_{max}$  y  $T_{max}$ : Es la concentración máxima de las concentraciones plasmáticas y el tiempo en que se alcanza esta concentración respectivamente. Se obtienen directamente de los datos experimentales y ofrecen una aproximación del grado y rapidez de absorción del producto tras la administración extravasal.
- El aclaramiento plasmático (Cl): Es la medida de la eficiencia de la eliminación del fármaco del plasma en función del tiempo o el volumen de sangre que es depurado del fármaco por unidad de tiempo. Este parámetro mide las pérdidas de fármaco debidas a los órganos metabolizadores y excretores y tiene en cuenta cualquier variación en el funcionalismo de estos órganos (Domenech 1990). Se calcula, tras la administración IV, mediante la fórmula:  $Cl = \text{Dosis} / AUC_0$  y se expresa como volumen de sangre de la que desaparece una sustancia por unidad de tiempo y su valor puede oscilar entre 0,1 ml/min hasta 3 L/min (Rowland y Tozer 1980c, Martínez 1998b).
- El volumen de distribución (Vd): Es la medida del grado de distribución del fármaco en el organismo o el volumen de agua corporal en la que es capaz de distribuirse una cantidad determinada de fármaco. Si bien su valor es sólo aparente, es constante para cada fármaco y es el parámetro que permite transformar concentraciones plasmáticas en cantidades totales de fármaco en el organismo (Domenech 1990). Se calcula tras la administración IV mediante la fórmula:  $Vd_{area} = \text{Dosis} / (AUC_0 \cdot \dots)$  o, lo que es lo mismo:  $Vd = Cl / \dots$  y está, por tanto, íntimamente relacionado con el aclaramiento plasmático. Si se realiza un ajuste a un modelo multicompartmental se pueden calcular también otros volúmenes de distribución, como el del compartimento central ( $Vd_c$ ) y el del estado de equilibrio ( $Vd_{ss}$ ). Su valor puede oscilar desde 0,1 a 500 L/kg. (Rowland 1994, Martínez 1998b).

Estos parámetros se calcularon mediante análisis no compartimental utilizando el programa informático WinNonlin<sup>viii</sup>, excepto  $Vd_c$  y  $Vd_{ss}$ . Asimismo, para poder definir más exactamente el comportamiento farmacocinético del fármaco en la especie bovina, se comprobó el posible ajuste a un modelo compartimental a partir de la evolución individual de las concentraciones plasmáticas tras la administración IV. Para ello se utilizó el programa informático PK Solutions<sup>ix</sup>.

#### **4.1.4.2 Estadística**

Para una mejor comprensión del grado de variabilidad de estos parámetros se realizó un estudio estadístico descriptivo, calculándose su valor medio y el grado de dispersión de los valores individuales respecto a la media (DS) para cada vía de administración. Aquellos parámetros comunes a ambas vías de administración fueron también comparados estadísticamente mediante el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) utilizando el programa informático SigmaStat<sup>x</sup>.

---

<sup>viii</sup> Versión 2.1 Copyright 1994-1998 Pharsight Corporation

<sup>ix</sup> Versión 2.0.2 Copyright 1997 David S. Farrier

<sup>x</sup> Versión 2.0 Copyright 1992-1995 Jandel Corporation

## **4.2 TOLERANCIA**

### **ESTUDIO DE TOLERANCIA DEL ETAMSILATO EN BÓVIDOS**

Este estudio se diseñó con el doble objetivo de comprobar la existencia de un margen de seguridad suficiente en la utilización terapéutica del etamsilato en bóvidos así como para estimar el grado de daño tisular producido, a nivel local, cuando se administra por vía IM. Para ello se utilizaron dos protocolos independientes. Por una parte se siguió un diseño experimental que pudiera evidenciar cualquier posible signo de intolerancia o reacción adversa a nivel sistémico tras la administración del etamsilato en condiciones forzadas y por vía IV (Tolerancia sistémica) y por otra parte se estudió la evolución de las concentraciones de un enzima indicativo del grado de destrucción tisular (CK), tras su administración por vía IM (Tolerancia local). Para evitar cualquier efecto subjetivo en la toma de datos, ambos protocolos se llevaron a cabo de forma ciega y aleatorizada y cumpliendo las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (Real Decreto 822/1993, OECD 1982) y las directrices recomendadas para estudios de tolerancia en la especie de destino de medicamentos veterinarios (Commission of The European Communities 1994).

#### 4.2.1 Animales

Cada animal fue identificado con un número mediante un crotal en la oreja y alojado en boxes individuales durante todo el estudio. Todos los animales dispusieron de una dieta basada en pienso estándar de mantenimiento sin contenido en agentes quimioterapéuticos o profilácticos, mientras que el agua se suministró *ad libitum* en bebederos automáticos.

##### a) Tolerancia sistémica

Para este estudio se utilizaron 10 terneros de raza frisona (5 machos y 5 hembras) con un peso inicial comprendido entre 146 y 245 kg y de unos 3 meses de edad. Tres días antes de iniciar el período experimental se realizó un ‘Control Previo’ en el transcurso del cual se llevó a cabo un examen físico de todos los animales así como una toma de muestras sanguíneas con objeto de determinar su estado de salud y confirmar que los valores hematológicos, hemostáticos y bioquímicos (hemograma completo, TP, TTPa, recuento de plaquetas así como albúmina, creatinina, ALP, GGT, AST, CK, GLDH, Na/K, proteínas séricas, glucosa y urea) se encontraban dentro del rango fisiológico normal para la especie bovina.

##### b) Tolerancia local

Para este estudio se utilizaron los mismos animales que para el estudio de Farmacocinética (6 terneros de raza frisona, de peso basal comprendido entre 162 y 202 kg y edad aproximada de cuatro meses) y en las mismas condiciones experimentales. Adicionalmente y de forma simultánea, se dispuso de tres animales control de las mismas características en cuanto a raza, edad y peso, que recibieron únicamente suero fisiológico y que actuaron

como control negativo. Estos animales se sometieron a los mismos controles previos que los ya descritos para el estudio de Farmacocinética (ver apartado 4.1).

#### 4.2.2 Tratamiento

##### a) Tolerancia sistémica

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos, uno tratado con etamsilato (n=6) y otro con placebo (n=4). La distribución final de los animales a cada grupo está expuesta en la Tabla 12. Para poder observar mejor cualquier posible efecto negativo a nivel sistémico se utilizó el doble de la dosis máxima y pauta normalmente utilizada y recomendada. Así, las pautas de tratamiento normalmente recomendadas para el etamsilato no superan los 5 días de administración, mientras que la pauta de dosificación utilizada en este estudio consistió en la administración del producto durante el doble de este período, es decir, 10 días por vía intravenosa a través de la vena yugular. Por otra parte, se utilizó una dosis de 25 mg/kg, en una única administración diaria, por corresponder al doble de la dosis máxima recomendada, mientras que el grupo Placebo recibió el mismo volumen de excipiente. La administración se realizó en el transcurso de la mañana y se escogió la vía intravenosa para evitar cualquier interferencia con la biodisponibilidad del producto por otras vías.

**Tabla 12. Características e identificación de los animales.**

ANIMAL N°	SEXO	Peso basal (kg)	Tratamiento
1	H	204	Placebo
2	H	220	Etamsilato
3	H	226	Etamsilato
4	M	224	Placebo
5	M	186	Etamsilato
6	M	195	Etamsilato
7	H	245	Etamsilato
8	M	196	Etamsilato
9	M	146	Placebo
10	H	224	Placebo

H: Hembra; M: Macho.

b) Tolerancia local

Para el estudio de la tolerancia local se administró etamsilato, por vía intramuscular (en la zona del músculo trapecio) en una única administración de 7,5 mg/kg de etamsilato a 6 terneros, mientras que otros 3 actuaron como control negativo y recibieron únicamente suero fisiológico. Se utilizó esta dosis por ser la utilizada en el estudio de farmacocinética que se realizó simultáneamente y que se consideró como representativa del rango de dosis normalmente utilizado. Las características de los animales tratados se encuentran descritas en la Tabla 10.

**4.2.3 Protocolo del estudio**

**4.2.3.1 *Fase de aclimatación***

Al inicio de ambos estudios, todos los animales pasaron un período de aclimatación en el cual permanecieron entre 5 y 7 días en las mismas condiciones en las que se iban a mantener durante la fase experimental del mismo. Durante este período ninguno de los animales recibió tratamiento medicamentoso alguno. Tres días antes del final de este período se procedió al pesaje de los animales y con el peso obtenido se calculó la dosis exacta a administrar para cada animal.

Durante todo el ensayo los animales dispusieron de pienso y agua *ad libitum*, excepto en el día de administración de los productos del estudio de Tolerancia Local, en que los animales estuvieron 16 horas en ayunas antes de recibir el tratamiento y no se les volvió a suministrar el pienso hasta transcurridas 8 horas desde la administración. Con ello se pretendía evitar posibles interferencias analíticas por la presencia de metabolitos en el plasma.

#### **4.2.3.2 Fase experimental**

##### **a) Tolerancia sistémica**

La fase experimental propiamente dicha constó de dos períodos, un período de tratamiento de 10 días de duración (Días 1 a 10) en el que la administración de los productos se llevó a cabo a diario y, a continuación, un período post-tratamiento de 5 días (Días 11 a 15). Durante ambos períodos se llevaron a cabo una serie de controles clínicos y muestreos de sangre para determinaciones hematológicas y bioquímicas, que se describen en el siguiente apartado.

##### **4.2.3.2.1 Examen clínico**

Se llevó a cabo el día 1, previamente a la administración del producto y se repitió todos los días durante el período de tratamiento a todos los animales con el objeto de detectar posibles signos de intolerancia al producto. Durante estos controles se valoraron los siguientes parámetros:

- *Estado general*
- *Actitud y estado de alerta*
- *Apetito*
- *Aspecto de las heces y orina*
- *Temperatura corporal*
- *Frecuencia respiratoria*
- *Frecuencia cardíaca*
- *Aspecto de las mucosas*
- *Alteraciones en el punto de inoculación*
- *Tiempo de relleno capilar e hidratación*
- *Motilidad intestinal*

El primer día tras el último tratamiento (día 11) se realizó el último examen clínico y también el pesaje de los animales. El día 15 (al final del período post tratamiento) se realizó

la exploración final y pesaje de todos los animales con el fin de descartar la aparición de una alteración tardía.

#### *4.2.3.2.2 Toma de muestras*

Con objeto de detectar las posibles alteraciones que el etamsilato pudiera producir en el organismo se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos, antes, durante y tras la administración del producto. Con dichas muestras se determinaron parámetros hematológicos y bioquímicos, que permitirían detectar alteraciones orgánicas en general y en particular en los órganos de metabolización y excreción. Asimismo, y dadas las indicaciones terapéuticas del etamsilato, se procedió al estudio de los parámetros hemostáticos más característicos.

Se extrajeron muestras de sangre de todos los animales los siguientes días:

- Día 1 (previamente a la administración del producto).
- Día 5 (tras 4 administraciones y antes de la 5ª administración)
- Día 11 (primer día después del período de tratamiento y tras 10 administraciones)

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular mediante sistema de extracción al vacío (Vacutainer). Para cada muestra se extrajeron tres tubos de sangre, uno para cada tipo de determinación:

- Un tubo conteniendo EDTA para el análisis de los parámetros hematológicos.
- Un tubo conteniendo Citrato sódico para las pruebas de hemostasia.
- Un tubo sin anticoagulante para la posterior obtención de suero para el análisis de los parámetros bioquímicos.

#### *Parámetros hematológicos*

Los tubos de sangre con EDTA para determinación de parámetros hematológicos se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su procesado, que se produjo en un intervalo de tiempo inferior a las 3 horas y en el que se determinaron los siguientes parámetros hematológicos:

- *Recuento de Eritrocitos*
- *Concentración de Hemoglobina*
- *Valor Hematocrito*
- *Volumen Corpuscular Medio (VCM)*
- *Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)*
- *Concentración Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)*
- *Recuento de Leucocitos totales*
- *Fórmula leucocitaria.*

Todos ellos se determinaron mediante un analizador semiautomático<sup>xi</sup> excepto el valor hematocrito, que se determinó mediante la técnica del microhematocrito, y la fórmula leucocitaria, que se realizó mediante el recuento visual sobre un total de 100 células teñidas mediante MayGrunwald-Giemsa.

#### *Parámetros hemostáticos*

Los tubos de sangre para las pruebas de hemostasia se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su procesado, que fue siempre inferior a las 3h tras la extracción de la muestra. Durante el procesado se centrifugaron a 2700 rpm (1200 g) durante 10 minutos para la obtención de plasma, el cual se mantuvo congelado entre -20 y -25°C hasta el momento de la realización de las pruebas.

Se determinaron el *Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPa)* y el *Tiempo de Protrombina (TP)* en plasma mediante un coagulómetro semiautomático<sup>xii</sup> utilizando kits<sup>xiii</sup> basados en técnicas estándar.

---

<sup>xi</sup> *Sysmex F800, TOA Instruments, Kobe, Japón*

<sup>xii</sup> *Stago ST4, Stago Diagnostic, Asnieres-Sur-Seine, Francia.*

El *recuento de plaquetas* se llevó a cabo en sangre entera mediante un contador celular semiautomático<sup>xii</sup>.

La elección de los parámetros tanto hematológicos como hemostáticos se ha realizado siguiendo las recomendaciones actuales respecto a estudios toxicológicos en hematología veterinaria (Lund 2000).

#### *Parámetros bioquímicos*

El tubo destinado al análisis bioquímico se mantuvo a temperatura ambiente de 1 a 2h para conseguir la adecuada coagulación de la sangre. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm (1520 g) durante 10 minutos para separar el suero, que se mantuvo congelado entre -20 y -25°C hasta el momento de la realización de las determinaciones de los parámetros bioquímicos.

Mediante analizador semiautomático de espectrofotometría se determinaron:

- *Urea*
- *Creatinina*
- *Proteínas totales*
- *Albúmina*
- *Cloruros*
- *Calcio*
- *Fosfatasa Alcalina (ALP)*
- *Bilirrubina total*
- *Aspartato Aminotransferasa (AST)*
- *Glutamato Deshidrogenasa (GLDH)*
- *Gamma Glutamil Transferasa (GGT)*
- *Creatin Fosfokinasa (CK)*

Y mediante fotometría de llama se determinó la concentración de Sodio y Potasio.

---

<sup>xiii</sup> *Boehringer Mannheim, Alemania.*

**Tabla 13. Resumen del diseño experimental**

DÍA	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
FASE	ACLIMATACIÓN							EXPERIMENTAL										SEGUIMIENTO					
ADMINISTRACIÓN PRODUCTO								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
PESAJE						X													X				X
EXAMEN CLÍNICO						X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS						X		X				X							X				
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS						X		X				X							X				
PARÁMETROS HEMOSTÁTICOS						X		X				X							X				

*b) Tolerancia local*

Para medir la tolerancia local del producto administrado por vía IM se controlaron los niveles plasmáticos del enzima Creatin Fosfokinasa (CK), como parámetro indicativo del grado de destrucción tisular (Roussel y cols. 1997b). Este método, basado en que el aumento de los niveles de CK refleja el daño tisular en el punto de inoculación, fue ya descrito por Cingolani y cols. en 1985 y es utilizado habitualmente para valorar el daño tisular de los fármacos administrados por esta vía en diversas especies animales, incluida la especie bovina (Gray 1981, Banting y Fanneau 1987, Surber y Dubach 1989, Pyörälä y cols. 1999).

Las muestras utilizadas para la determinación de CK fueron las correspondientes a las 0 (basal), 1, 2, 4, 6, 8 y 10 h tras la administración de etamsilato o suero fisiológico por vía IM. Esta sangre se recogió en tubos con heparina y se centrifugó a 3000 rpm (1520 g) durante 10 min. El plasma resultante se congeló entre -20°C y -30°C hasta su análisis para la determinación de CK plasmática mediante analizador semiautomático de espectrofotometría.

Asimismo, durante todo el período de muestreo se examinó el punto de inoculación en busca de posibles síntomas locales de intolerancia.

#### **4.2.4 Tratamiento de los datos**

##### **a) Tolerancia sistémica**

La determinación de la tolerancia general de la administración del etamsilato en bóvidos bajo la pauta de dosificación establecida en este estudio se llevó a cabo en base al estudio de la evolución del estado clínico de los animales, así como de los parámetros analíticos controlados en el transcurso de la prueba y en comparación con los resultados del grupo de animales que actuaron como control negativo.

Para la detección de cualquier signo de intolerancia se efectuó un seguimiento individualizado de cada animal. Para ello se tuvieron en cuenta unos márgenes admisibles para cada parámetro hematológico, bioquímico y hemostático. En caso de obtener valores fuera del rango establecido, se valoró la evolución del animal durante el tratamiento en conjunción con lo observado en las exploraciones clínicas.

##### **b) Tolerancia local**

Para el estudio de la tolerancia local se observaron las concentraciones plasmáticas de CK en relación con el suero fisiológico. Se calculó su AUC (mediante el método log-trapezoidal descrito en el apartado 4.1.4.1) para poder comparar los niveles de esta enzima a lo largo del tiempo respecto al control negativo (suero fisiológico) y valorar así el grado de daño tisular ejercido por la inyección IM de etamsilato según el método descrito por Cingolani y cols. (1985).

##### **4.2.4.1 Estadística**

Se realizó un estudio estadístico comparativo de los valores de cada parámetro entre el grupo tratado y el grupo control, así como respecto a las diferencias respecto a sus correspondientes valores basales. Para ello se utilizó el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) mediante el programa informático SigmaStat<sup>xiv</sup>.

---

<sup>xiv</sup> *Versión 2.0 Copyright 1992-1995 Jandel Corporation*

### **4.3 EFICACIA**

#### **EFEECTO DEL ETAMSILATO SOBRE LA HEMOSTASIA EN LA ESPECIE BOVINA**

Tal como se comenta en el capítulo 3, el presente estudio se diseñó para valorar el efecto de la administración de etamsilato como fármaco antihemorrágico en la especie bovina. Para ello se utilizó el test del Tiempo de Sangría (TS), por ser éste un parámetro estrechamente relacionado con la funcionalidad de la hemostasia primaria sobre la cual actúa el etamsilato y haberse también utilizado como parámetro de eficacia de este fármaco en otras especies animales (Laporte y Esteve 1967, Esteve 1960a, Esteve y cols. 1959, Canal 1964, Vinazzer 1980).

Al igual que en el caso del estudio farmacocinético se ha utilizado un diseño cruzado de modo que todos los animales recibieron etamsilato y placebo en dos fases separadas entre ellas cuatro semanas, tiempo suficiente como para garantizar la ausencia de interferencias en la determinación del TS. Además, con la finalidad de garantizar la máxima objetividad de los resultados del estudio, la determinación del TS se llevó a cabo de forma ciega, es decir, sin que el responsable de dicha determinación conociera cuál es

el producto administrado al animal. El estudio se llevó a cabo cumpliendo las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (Real Decreto 822/1993, OECD 1982).

#### **4.3.1 Animales**

Se utilizaron 10 animales de raza frisona (5 machos y 5 hembras) con un peso de entre 182 y 276 kg. Cada animal fue identificado con un número mediante un crotal en la oreja y alojado en una nave con cuadras acondicionadas para la especie bovina. Todos los animales estaban clínicamente sanos y presentaban unos parámetros hematológicos, bioquímicos y hemostáticos dentro de los rangos fisiológicos normales para esta especie (hemograma completo, albúmina, creatinina, ALP, GGT, AST, CK, GLDH, Na/K, proteínas séricas, glucosa, urea, TP, TTPa y recuento de plaquetas).

Todos los animales se mantuvieron durante un período previo de adaptación de 7 días en las mismas condiciones que tuvieron en las fases experimentales del estudio. Durante los últimos 15 días previos al tratamiento ningún animal recibió tratamiento medicamentoso alguno. Durante todo el período de adaptación así como durante el período experimental, cada animal dispuso de una dieta a base de pienso estándar de mantenimiento sin contenido en agentes quimioterapéuticos o profilácticos, mientras que el agua se suministró *ad libitum* en bebederos automáticos.

#### **4.3.2 Tratamientos**

El grupo tratado con etamsilato recibió una dosis de 12,5 mg/kg. Esta dosis corresponde a la dosis máxima de las recomendadas por el fabricante del fármaco comercial y, por tanto, es con la que se pueden medir más fácilmente sus efectos de forma experimental.

Se seleccionó la vía intravenosa por ser la vía que permite disponer de todo el fármaco en sangre con mayor brevedad de tiempo y valorar, de este modo, el efecto del etamsilato sobre el TS independientemente de su potencial de absorción a través de otras vías de administración.

El grupo Placebo recibió el mismo volumen de excipiente a fin de eliminar la posibilidad de detectar efectos sobre la hemostasia debidos a factores distintos a la acción del etamsilato.

#### ***4.3.3 Protocolo del estudio***

El estudio se llevó a cabo de forma cruzada en dos fases (I y II). En el transcurso de cada una de las dos fases, 5 de los animales recibieron etamsilato y los otros 5 placebo, intercambiándose en la fase siguiente de modo que al final del mismo todos los animales habían recibido tanto etamsilato como Placebo.

La distribución de los animales a cada grupo y fase experimental, así como el orden en el cual los productos fueron administrados a cada animal se estableció siguiendo un modelo de asignación aleatoria y quedó establecido de la forma que se describe en Tabla 14.

**Tabla 14. Esquema del diseño cruzado de la administración de los productos**

<b>ANIMAL N°</b>	<b>SEXO</b>	<b>Peso basal (kg)</b>	<b>FASE I</b>	<b>FASE II</b>
1	H	240	Etamsilato	Placebo
2	H	255	Placebo	Etamsilato
3	H	257	Placebo	Etamsilato
4	M	272	Etamsilato	Placebo
5	M	231	Placebo	Etamsilato
6	M	232	Etamsilato	Placebo
7	H	276	Etamsilato	Placebo
8	M	242	Etamsilato	Placebo
9	M	182	Placebo	Etamsilato
10	H	258	Placebo	Etamsilato

H: Hembra; M: Macho.

Los productos se administraron por vía intravenosa a través de la vena yugular, en dosis única. Entre las fases I y II se dejó transcurrir un período de cuatro semanas con el objetivo de asegurar la ausencia de interferencias del producto administrado durante la primera fase, así como para permitir la cicatrización de los cortes ocasionados en las extremidades por los dispositivos de corte.

#### Parámetros:

En ambas fases se realizaron, a todos los animales, las determinaciones del TS, como variable principal, antes y después de la administración del etamsilato o del placebo.

Para la determinación del efecto del etamsilato sobre el TS se midió primero el TS basal o previo, antes de la administración del producto. A continuación se administró el producto correspondiente a cada animal y, transcurridas dos horas, se repitió la determinación del TS que correspondería al valor del TS final.

El intervalo de dos horas transcurrido entre la administración del producto y la determinación del TS se ha escogido por ser el momento de máximo efecto sobre el TS en pruebas anteriores realizadas en animales de laboratorio (Laporte y Esteve 1967).

En los mismos tiempos en que se determinó el TS, se obtuvieron también muestras de sangre para detectar posibles alteraciones en TP, TTPa y el recuento de plaquetas, que indicarían la existencia de algún malfuncionamiento del sistema hemostático de los animales que podría enmascarar los resultados del TS.

#### ***4.3.3.1 Preparación de los animales***

A cada animal se le rasuró una superficie de unos 4 x 4 cm en la cara lateral de la porción media de ambos antebrazos para la realización del TS (esta zona se caracteriza

anatómicamente por estar libre de grandes venas superficiales). Se prefirió esta localización a la descrita por Sullivan y cols en 1994 (parte rostral del rodete dental) por permitir la realización repetida del test sin necesidad de sedación o una sujeción excesivamente forzada.

El día anterior al del inicio de la primera fase experimental se pesaron los animales. El peso de cada animal se utilizó para calcular la dosis exacta de producto que debía recibir cada animal.

Del mismo modo, el día anterior al del inicio de la 2ª fase experimental se llevó a cabo una nueva exploración clínica de los animales, un nuevo pesaje para el ajuste de dosis y se extrajeron muestras de sangre para comprobar la efectiva normalización de todos los parámetros antes de proceder a la segunda administración de producto y determinación de los TS.

#### ***4.3.3.2 Tiempos de sangría***

El modelo experimental que se aplicó es el Test del TS en bóvidos según modificación de la técnica descrita en el caballo por Kopp y cols. (1985) y Monreal y cols. (1995b).

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- En primer lugar se provocó una venostasis estándar de la extremidad mediante la colocación de un esfingomanómetro en la región proximal de la misma ejerciendo una presión continuada de unos 40 mm de Hg (aprox.) durante un minuto.
- Seguidamente, en la zona previamente rasurada de la porción media de la cara lateral del antebrazo se aplicaron dos dispositivos cada uno de los cuales dispara dos pequeñas cuchillas de dimensiones estándar provocando unas incisiones de 5 mm de longitud

por 1 mm de profundidad en la piel<sup>xv</sup>. Los dispositivos se utilizaron simultáneamente y uno junto al otro, por lo que se obtuvieron cuatro incisiones contiguas en línea horizontal.

- A continuación se fue retirando la sangre que fluía gota a gota a través de estas cuatro incisiones mediante un papel de filtro que se aplicaba de forma puntual procurando no contactar con la superficie del corte para no interferir en la hemostasia. Tal como se comenta en el apartado 2.2.1.2, de este modo se minimiza el efecto de los factores de coagulación presentes en la sangre garantizándose al máximo que el control de la hemorragia esté siendo regulado principalmente por la interacción plaquetas-endotelio vascular (hemostasia primaria).
- Finalmente se registró el tiempo que tardó cada una de las cuatro incisiones en dejar de sangrar, anotando cualquier anomalía observada que pudiera invalidar el resultado (corte poco profundo, presencia de vaso sanguíneo superficial próximo al corte, etc.). El valor del TS fue la media de los tiempos válidos de las cuatro incisiones.

#### ***4.3.3.3 Muestras de sangre***

Durante el estudio se llevó a cabo la determinación de los parámetros hemostáticos siguientes:

- *Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPa)*
- *Tiempo de Protrombina (TP)*
- *Recuento de plaquetas.*

Estos parámetros se analizaron en muestras tomadas inmediatamente tras la realización de cada TS a todos los animales. De este modo, al igual que en el caso del TS, se obtuvo

---

<sup>xv</sup> *Simplite II, Organon Teknika Co, Durham, NC. EEUU.*

un valor previo a la administración del tratamiento (etamsilato o placebo) y otro a cabo de dos horas de la administración.

Las muestras de sangre se extrajeron de la vena yugular, mediante tubo vacutainer, y se mantuvieron en refrigeración en tubos con citrato sódico hasta el momento de su procesado, que fue siempre inferior a las 3h tras la extracción de la muestra. Durante el procesado se centrifugaron a 2700 rpm (1200 g) durante 10 minutos para obtener el plasma, el cual se mantuvo congelado entre  $-20$  y  $-25^{\circ}$  C hasta el momento de la realización de las pruebas.

El TP y TTPa se determinaron en plasma mediante un coagulómetro semiautomático<sup>xvi</sup> utilizando kits<sup>xvii</sup> basados en las técnicas estándar, mientras que el recuento de plaquetas se llevó a cabo, en sangre entera, mediante un contador celular semiautomático<sup>xviii</sup>.

El TTPa se ha realizado por ser uno de los tests más sensibles para detectar deficiencias en los factores de coagulación, especialmente de la vía intrínseca. Por otra parte el TP es más sensible para detectar deficiencias en factores de la vía extrínseca. Si bien el TS, como parámetro de medida de la eficacia del etamsilato, no se ve influenciado por posibles alteraciones en la hemostasia secundaria, se consideró oportuno realizar estos tests para poder detectar cualquier anomalía en los animales, que pudiera ser indicativa de un malfuncionamiento en su sistema hemostático que pudiera alterar los resultados de la prueba. Por otra parte, aunque todo indica que el etamsilato actúa únicamente al nivel de la hemostasia primaria, la ausencia de cualquier tipo de estudios en la especie bovina no permite descartar que se observe alguna modificación de estos parámetros tras el tratamiento con etamsilato.

---

<sup>xvi</sup> *Stago ST4, Stago Diagnostic, Asnieres-Sur-Seine, Francia.*

<sup>xvii</sup> *Boehringer Mannheim, Alemania.*

<sup>xviii</sup> *Sysmex F800, TOA Instruments, Kobe, Japón*

El recuento de plaquetas se realizó debido a la influencia directa que una deficiencia en la concentración hemática de las mismas puede tener sobre el alargamiento del TS (Hathaway y Goodnight 1993b). Por otra parte, tal como han descrito Esteve y cols. en la especie humana (Esteve y cols. 1960b y Esteve y cols. 1961), no está descartado que el etamsilato pudiera modificar de algún modo el número de plaquetas circulantes.

#### ***4.3.4 Tratamiento de los datos***

El TS constituye la variable principal para determinar la eficacia del etamsilato. Para obtener el valor más objetivo posible, cada uno de los TS correspondió al valor de la media de los tiempos válidos obtenidos a partir de las cuatro incisiones realizadas a cada animal.

Obtenidos los valores de TS previos a la aplicación del producto y los posteriores transcurridas dos horas de la misma, se calcularon las diferencias entre el TS previo y posterior de cada animal (expresadas en segundos y en porcentaje de variación respecto al TS previo).

Las variables secundarias (TP, TTPa y el recuento de plaquetas), se trataron de la misma manera, obteniendo las diferencias entre los valores previos y posteriores a la aplicación del producto de cada animal, en las unidades correspondientes, así como en porcentaje de variación respecto al valor previo.

##### ***4.3.4.1 Estadística***

Los valores correspondientes a los TS previo y posterior a la administración del producto, así como las diferencias entre ellos (tanto expresados en segundos como en porcentajes) así como los valores de los parámetros hemostáticos y las diferencias entre

los parámetros hemostáticos previo y posterior obtenidos para cada uno de los productos (etamsilato y placebo) en cada uno de los animales, se compararon mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) y de correlación (Spearman) utilizando el programa informático SigmaStat<sup>xix</sup>.

---

<sup>xix</sup> *Versión 2.0 Copyright 1992-1995 Jandel Corporation*

## **Capítulo 5**

# **RESULTADOS**

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 FARMACOCINÉTICA**

#### **ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DEL ETAMSILATO EN BÓVIDOS TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA E INTRAMUSCULAR A DOSIS ÚNICA**

##### ***5.1.1 Estado de los animales***

De los exámenes físicos diarios de los terneros se puede afirmar que su estado general fue satisfactorio. Asimismo el consumo de pienso y agua fueron considerados correctos en todos los animales del estudio.

### 5.1.2 Niveles plasmáticos de etamsilato

#### 5.1.2.1 *Tras la administración intravenosa*

Los niveles plasmáticos medios, determinados tras la administración intravenosa a cada tiempo de muestreo, se encuentran descritos en la Tabla 15 y su representación gráfica en las Figuras 17 y 18.

**Tabla 15. Concentración de etamsilato en plasma ( $\mu\text{g/ml}$ ) tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg por vía IV (n=10)**

<b>Tiempos</b>	<b>Media</b>	<b>DS</b>
<b>Basal</b>	-	-
<b>5 min</b>	38,53	2,8
<b>10 min</b>	29,11	4,3
<b>20 min</b>	23,56	3,1
<b>30 min</b>	17,04	2,3
<b>1 h</b>	12,75	6,1
<b>2 h</b>	4,42	1,4
<b>3 h</b>	2,15	0,9
<b>4 h</b>	1,07	0,5
<b>5 h</b>	0,62	0,3
<b>6 h</b>	0,38	0,1
<b>7 h</b>	0,35	0,1
<b>8 h</b>	0,18	0,1
<b>9 h</b>	0,14	0,1
<b>10 h</b>	0,13	0,03

Figura 17. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de etamsilato respecto al tiempo tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg por vía IV (n=6; Media  $\pm$ DS)

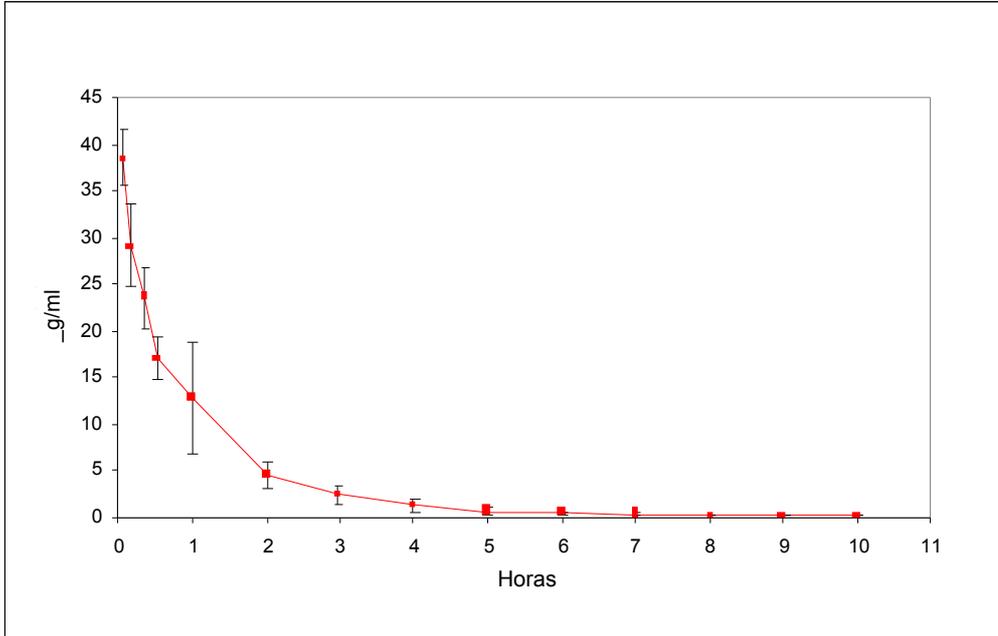
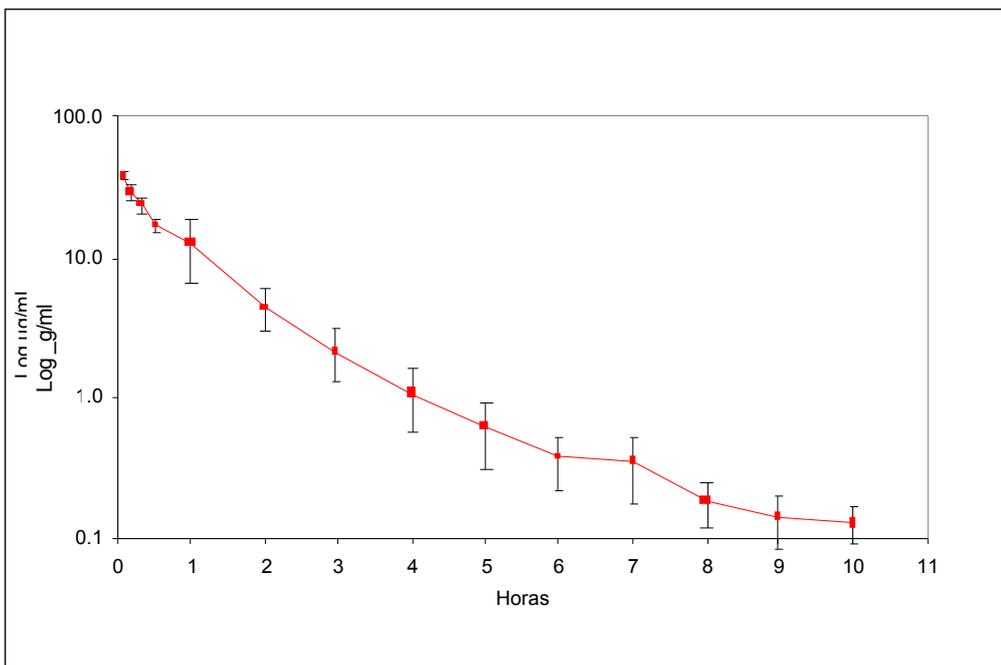


Figura 18. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de etamsilato respecto al tiempo tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg por vía IV. Escala semilogarítmica (n=6; Media  $\pm$ DS)

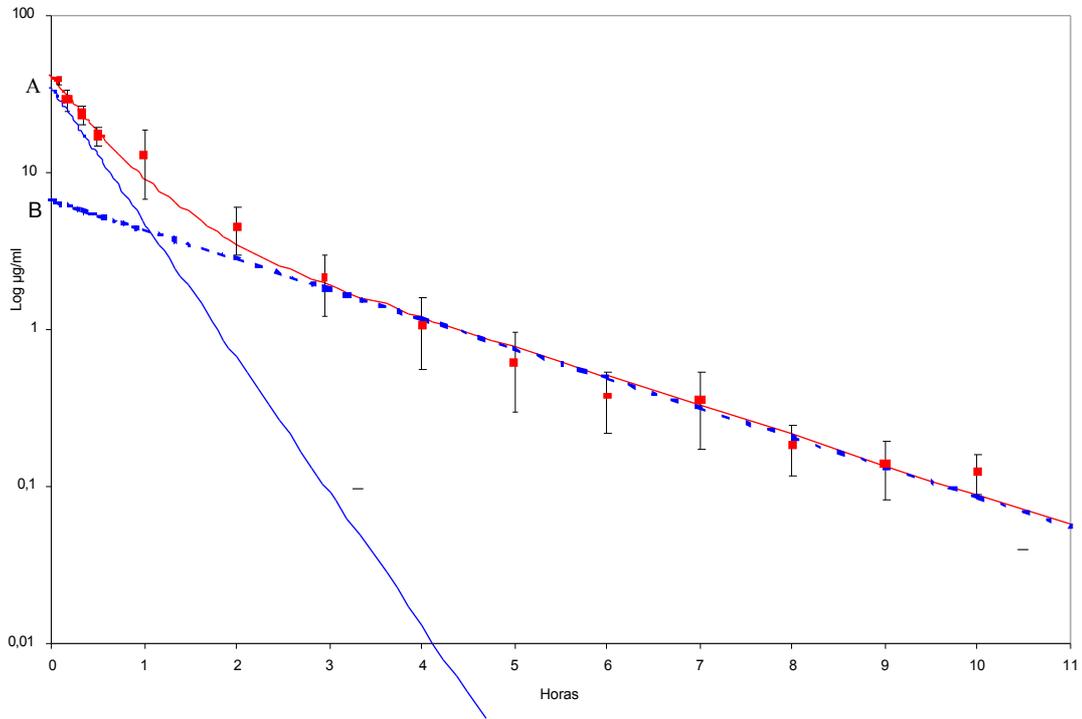


Se puede observar una disminución muy rápida de las concentraciones plasmáticas, desde valores por encima de 38 µg/ml a los 5 minutos de la administración a menos de la mitad (17 µg/ml) en tan sólo 30 minutos, para bajar a niveles inferiores a 1 µg/ml a las 5 horas y por debajo de 0,20 µg/ml a partir de las 8 horas.

Dada la rápida disminución de las concentraciones de etamsilato, el frecuente muestreo realizado durante la primera media hora tras la administración parece haber sido adecuado para definir las fases iniciales de la cinética plasmática y permiten visualizar una rápida fase inicial, en la que predominarían los fenómenos de distribución, que muestra una pendiente bien diferenciada respecto a una segunda fase, más lenta, en la que predominaría la eliminación. De hecho, el perfil de concentraciones plasmáticas individual se pudo ajustar con mayor precisión a un modelo bicompartimental en todos los animales. Este modelo se rige por una función biexponencial del tipo:  $C_p = A \cdot e^{-\lambda_1 t} + B \cdot e^{-\lambda_2 t}$ ; en la que  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son las constantes híbridas que definen los procesos de distribución y de eliminación respectivamente ( $\lambda_1 = 1,96 \pm 0,6 \text{ h}^{-1}$ ;  $\lambda_2 = 0,43 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ ) mientras que A y B representan los puntos de intersección con el eje de ordenadas de las respectivas rectas de regresión de los valores concentración/tiempo (A= 34,3±4,7 µg/ml; B= 6,7±3,7 µg/ml). Ver Figura 19.

Por otra parte, aunque no se obtuvieron muestras más allá de las 10 h, las concentraciones obtenidas en los últimos tiempos de muestreo fueron ya muy bajas (cerca de 0,1 µg/ml) por lo que no es probable que se haya producido una pérdida de información relevante.

**Figura 19. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de etamsilato respecto al tiempo y su predicción según el modelo bicompartimental tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg por vía IV (n=6; Media  $\pm$ DS).**



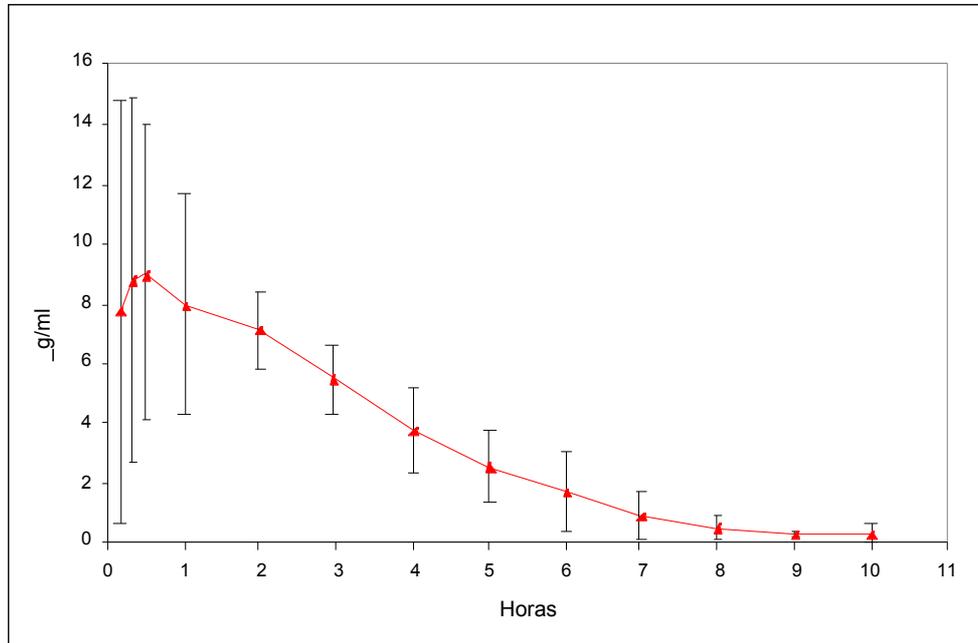
### 5.1.2.2 *Tras la administración intramuscular*

Los niveles plasmáticos medios, determinados tras la administración intramuscular a cada tiempo de muestreo, se encuentran descritos en la Tabla 16 y su representación gráfica en las Figuras 20 y 21.

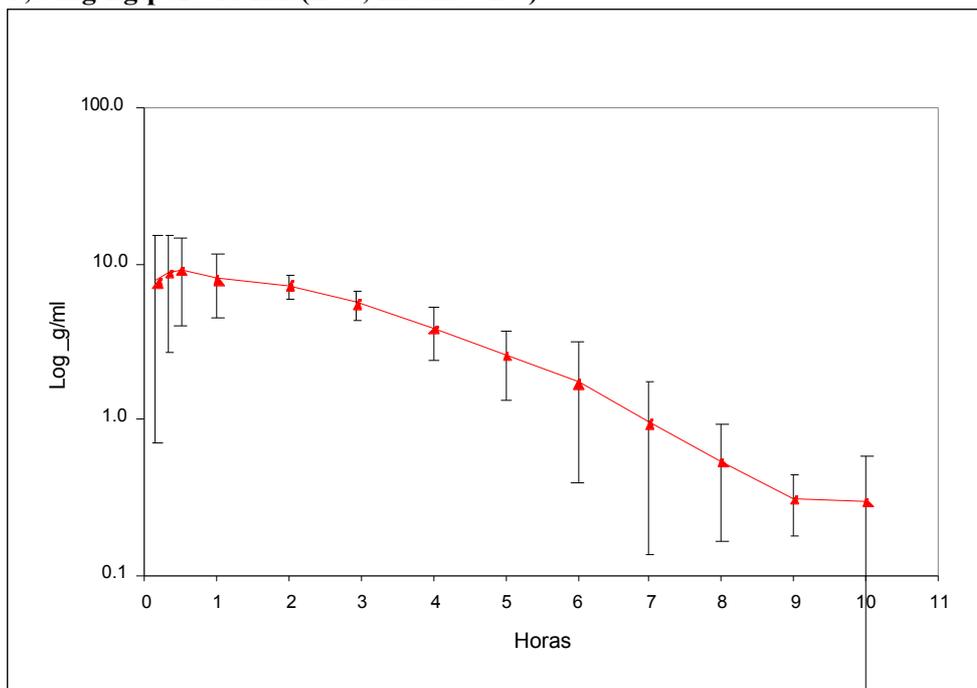
**Tabla 16. Concentración de etamsilato en plasma ( $\mu\text{g/ml}$ ) tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg por vía IM (n=6)**

<b>Tiempos</b>	<b>Media</b>	<b>DS</b>
<b>Basal</b>	-	-
<b>5 min</b>	-	-
<b>10 min</b>	7,74	7,06
<b>20 min</b>	8,79	6,09
<b>30 min</b>	9,02	4,95
<b>1 h</b>	8	3,65
<b>2 h</b>	7,12	1,28
<b>3 h</b>	5,5	1,18
<b>4 h</b>	3,8	1,42
<b>5 h</b>	2,54	1,24
<b>6 h</b>	1,72	1,32
<b>7 h</b>	0,94	0,8
<b>8 h</b>	0,53	0,37
<b>9 h</b>	0,31	0,13
<b>10 h</b>	0,3	0,29

**Figura 20. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de etamsilato respecto al tiempo tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg por vía IM (n=6; Media  $\pm$ DS)**



**Figura 21. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de etamsilato respecto al tiempo tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg por vía IM (n=6; Media  $\pm$ DS)**



Tras la administración IM se observa una absorción rápida, aunque con valores muy variables, para luego eliminarse rápidamente alcanzando concentraciones medias de tan sólo 0,3 µg/ml a las 10 h. Según las concentraciones observadas se puede deducir que la  $C_{max}$  se sitúa en tiempos posteriores a los 30 minutos. La gran variabilidad observada durante la fase de absorción se va reduciendo paulatinamente a partir de las 2h de la administración, de modo que se obtiene un perfil de concentraciones que descienden de forma más homogénea hasta el final del período experimental. Al igual que en el caso de la vía IV, el no disponer de muestras más allá las 10 h, no parece haber supuesto una pérdida de información relevante dadas las bajas concentraciones halladas en los últimos tiempos de muestreo.

### **5.1.3 Parámetros farmacocinéticos**

En la **Tabla 17** se describen los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa e intramuscular.

El valor de  $T_{1/2}$  fue corto, por lo que el período de lavado entre las dos fases en que se realizó el estudio, que fue de 5 días, corresponde a un múltiplo muy superior a 10 veces este valor, que según Gich (1990) sería lo mínimo aconsejable para estudios de biodisponibilidad con diseño cruzado. Por tanto, sobre la base de estos resultados, se ha confirmado que el diseño de este estudio fue adecuado para evitar interferencias entre ambas administraciones.

Tras la administración IV se observan unos valores de  $AUC_{0-24h}$  muy próximos a los de  $AUC_0$  ( $37,3 \pm 7,7$  y  $37,6 \pm 7,7$  µg.h/ml respectivamente), representando un porcentaje de extrapolación medio inferior al 1% de la segunda respecto a la primera. Tras la administración IM este porcentaje fue algo mayor, pero todavía inferior al 2%, lo que confirma, en ambos casos, que el período de muestreo fue suficiente para poder definir adecuadamente el perfil farmacocinético del etamsilato en terneros.

**Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg de etamsilato por vía IV o IM en terneros (n=6; Media  $\pm$ DS)**

	IV	IM
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	--	1,3 $\pm$ 1,2
<b>C<sub>max</sub> (<math>\mu</math>g/ml)</b>	--	10,7 $\pm$ 4,8
<b>AUC<sub>0-10h</sub> (<math>\mu</math>g.h/ml)</b>	37,3 $\pm$ 7,6	34,5 $\pm$ 1,9
<b>AUC<sub>0-<math>\infty</math></sub> (<math>\mu</math>g.h/ml)</b>	37,6 $\pm$ 7,7	35,0 $\pm$ 1,9
<b>AUMC<sub>0-<math>\infty</math></sub> (<math>\mu</math>g.h/ml)</b>	52,0 $\pm$ 14,0	98,6 $\pm$ 29,9
<b>T<sub>1/2</sub> (h)</b>	1,49 $\pm$ 0,16	1,24 $\pm$ 0,14
<b><math>\lambda</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	0,47 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,07
<b>Vd<sub>area</sub> (L/kg)</b>	0,44 $\pm$ 0,10	--
<b>Vd<sub>c</sub> (L/kg)</b>	0,19 $\pm$ 0,07	--
<b>Vd<sub>ss</sub> (L/kg)</b>	0,26 $\pm$ 0,11	--
<b>Cl (L/h.kg)</b>	0,21 $\pm$ 0,04	--
<b>MRT (h)</b>	1,37 $\pm$ 0,14 *	2,83 $\pm$ 0,87 *
<b>MAT (h)</b>	--	1,46 $\pm$ 1,0
<b>F (%)</b>	--	98,4 $\pm$ 22

Valores con asterisco (\*) muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambas vías de administración (P<0,05).

Los volúmenes de distribución son moderados y son superiores los del Vd<sub>area</sub> (que incluye el área de la fase de eliminación) a los de Vd<sub>ss</sub> (Vd del punto de inflexión entre la curva de distribución y de eliminación) y a su vez superiores a los del Vd<sub>c</sub>. Los valores de Cl son relativamente elevados, con una  $\lambda$  también alta. Todo ello da lugar a una corta vida media de eliminación observada para ambas vías de administración. El valor de la biodisponibilidad por la vía IM es muy alto (F próxima al 98% al comparar las AUC<sub>0</sub> de ambas vías de administración) y, a pesar de alcanzar concentraciones máximas muy inferiores a la vía IV, estas son más constantes y duraderas tras la administración IM. El bajo porcentaje de extrapolación de las AUC<sub>0-10h</sub> respecto a AUC<sub>0- $\infty$</sub>  en ambas vías de administración permite otorgar una elevada fiabilidad a la extrapolación a infinito. El valor de MRT tras la administración IM es superior al observado tras la administración IV con diferencias estadísticamente significativas.



## **5.2 TOLERANCIA**

### **5.2.1 Tolerancia sistémica**

#### **5.2.1.1 *Estado de los animales***

Durante el examen físico realizado previamente al inicio de la fase experimental, todos los animales estuvieron clínicamente sanos. Asimismo, todos los parámetros analíticos sanguíneos (hematológicos, hemostáticos y bioquímicos) se encontraron dentro de unos intervalos normales para la especie bovina o muy próximos a ellos, a excepción de ALP. Este parámetro se encontraba por encima de la normalidad en todos los animales, fenómeno atribuido a la corta edad de los mismos y su rápido crecimiento, puesto que los valores de referencia están basados en animales adultos (Roussel 1997a, Knowles y cols. 2000). Por otra parte, los valores de urea y creatinina se encontraron algo disminuidos, lo que puede atribuirse al ayuno en que se encontraban los animales en el momento de la extracción. En base a los resultados de los demás parámetros, así como a los de la exploración clínica de los animales llevada a cabo durante este control, se consideró que todos ellos presentaban un estado clínico sano y, por tanto, aptos para ser incluidos en el ensayo.

### **5.2.1.2 Evolución clínica de los animales**

#### *5.2.1.2.1 Parámetros clínicos*

Todos los parámetros clínicos estudiados permanecieron dentro de la normalidad en las exploraciones realizadas durante todo el periodo de tratamiento, sin que se detectara ningún síntoma de intolerancia al producto en ninguno de los dos grupos.

#### *5.2.1.2.2 Parámetros sanguíneos*

En general, los parámetros estudiados permanecieron, en ambos grupos, dentro de la normalidad o muy próximos a ella durante los controles del Día 0 (previo al tratamiento), Día 5 (tras 4 días de administración) y Día 11 (el día siguiente a la finalización del tratamiento tras 10 días de administración), sin que ninguna desviación del rango normal pudiera considerarse clínicamente relevante.

#### *Parámetros hematológicos*

Los valores medios y desviaciones estándar de cada parámetro en los controles del Día 0, 5 y 11 se encuentran en la Tabla 18 y en la Figura 22.

Todos los parámetros se encontraron dentro del rango de valores de referencia, por lo que no puede atribuirse efecto alguno del tratamiento sobre estos parámetros. No obstante, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales de hemoglobina entre ambos grupos, pero no en los valores al Día 11. Tampoco se observaron diferencias entre los valores del Día 11 y Día 0 dentro del grupo tratado, aunque sí una ligera tendencia a aumentar. Asimismo, los valores al Día 11 de HCM

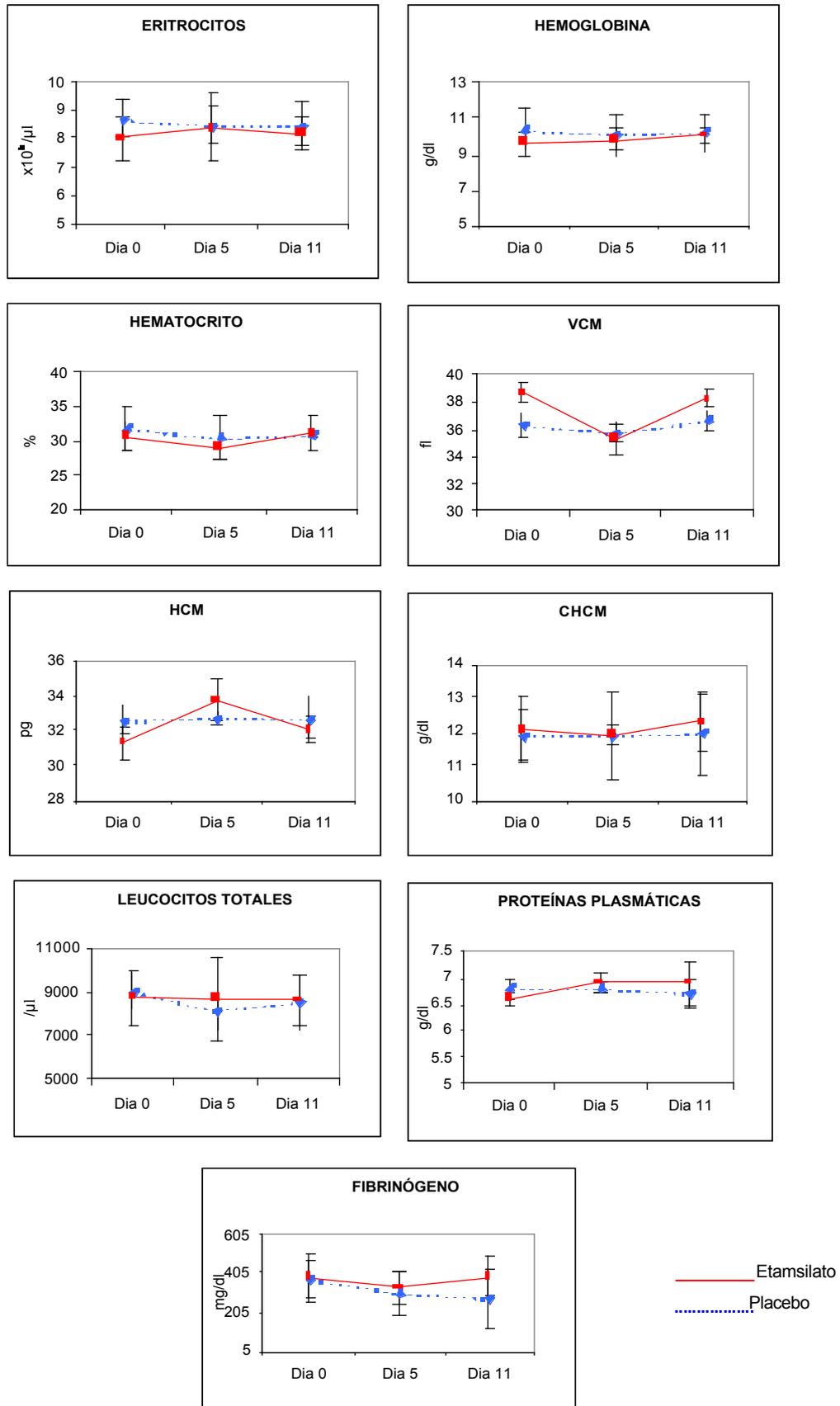
mostraron diferencias significativas entre los dos grupos, pero no entre los del Día 11 y Día 0 dentro del grupo tratado.

**Tabla 18. Resultados de los parámetros hematológicos (n=10; Media ±DS)**

	Valores de referencia	Etamsilato			Placebo		
		Día 0	Día 5	Día 11	Día 0	Día 5	Día 11
<b>Eritrocitos (x10<sup>6</sup> /μl)</b>	(5-10)	8,0 ±0,8	8,4 ±1,2	8,2 ±0,6	8,7 ±0,7	8,5 ±0,7	8,5 ±0,8
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	(8-15)	9,6 ±0,6 *	9,8 ±0,6	10,0 ±0,4	10,4 ± 1,1 *	10,1 ±1,2	10,2 ± 1,1
<b>Hematocrito (%)</b>	(24-46)	30,7 ±2,2	29,1 ±1,7	31,2 ±0,7	31,8 ±3,2	30,5 ±3,3	31,0 ±2,7
<b>VCM (fl)</b>	(34,6-50)	38,7 ±2,5	35,3 ±3,7	38,3 ±2,3	36,4 ±2,1	35,8 ±1,8	36,7 ±2,7
<b>HCM (pg)</b>	(30-36)	31,3 ±0,9	33,7 ±1,3	32,1 ±0,8 *	32,6 ±0,8	32,8 ±0,3	32,7 ± 1,2 *
<b>CHCM (g/dl)</b>	(11-17)	12,1 ±0,7	11,9 ±1,1	12,3 ±0,6	11,9 ±0,9	11,9 ±0,7	12,0 ±0,7
<b>Leucocitos Totales (/μl)</b>	(4000-12000)	8783 ±1303	8733 ±1880	8667 ±1140	9075 ±862	8150 ±806	8575 ±1215
<b>Fórmula leucocitaria:</b>							
<b>Linfocitos (/μl)</b>	(2500-7500)	4971 ±943	5137 ±806	5061 ±849	4702 ±854	4376 ±386	5536 ±1283
<b>Monocitos (/μl)</b>	(25-840)	274 ±114	253 ±271	428 ±264	373 ±245	386 ±47	571 ±257
<b>Neutrófilos en banda (/μl)</b>	(0-120)	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0
<b>Neutrófilos segmentados (/μl)</b>	(600-4000)	3334 ±553	3344 ±1125	3024 ±494	3725 ±1672	3310 ±1199	2387 ±560
<b>Eosinófilos (/μl)</b>	(0-2400)	31,3 ±76,8	0,0 ±0,0	78,8 ±77,4	70,3 ±47,3	78,0 ±91,0	120,0 ±94,8
<b>Basófilos (/μl)</b>	(0-200)	11,3 ±27,8	0,0 ±0,0	75,8 ±77,0	25,0 ±50,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0
<b>Proteínas plasmáticas (g/dl)</b>	(6-8)	6,6 ±0,1	6,9 ±0,2	6,9 ±0,4	6,8 ±0,2	6,8 ±0,1	6,7 ±0,3
<b>Fibrinógeno (mg/dl)</b>	(200-600)	383 ±117	333 ±82	383 ±98	375 ±96	300 ±115	275 ±150

Valores con asterisco (\*) muestran diferencias significativas del tratamiento con etamsilato respecto al placebo (P<0,05).

Figura 22. Representación gráfica de la evolución de los principales parámetros hematológicos (Media  $\pm$  DS)



### *Parámetros hemostáticos*

Los valores medios y desviaciones estándar de cada parámetro en los controles al Día 0, Día 5 y Día 11 se encuentran en la Tabla 19 y en la Figura 23.

Todos los valores de cada animal se encontraron dentro del rango de valores de referencia de la especie bovina. Ninguno de los parámetros mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

### *Parámetros bioquímicos*

Los valores medios y desviaciones estándar de cada parámetro en los controles al Día 0, Día 5 y Día 11 se encuentran en la Tabla 20 y en la Figura 24.

Varios parámetros bioquímicos se encontraron fuera del rango de valores normales de referencia para la especie bovina en alguno de los puntos de muestreo en ambos grupos, como ALP y GLDH, o en el grupo control únicamente, como la urea. No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $P > 0,05$ ) ni se observó una tendencia a la alteración durante el transcurso del período experimental que pudiera ser atribuida al efecto del etamsilato. Los valores de ALP se mantuvieron marcadamente elevados respecto a los valores de referencia en todos los animales de ambos grupos en todos los puntos de muestreo, fenómeno atribuible, según diversos autores, a la corta edad de los animales (Roussel 1997a, Knowles y cols. 2000).

**Tabla 19. Resultados parámetros hemostáticos (n=10; Media ±DS)**

	Valores de referencia	Etamsilato			Placebo		
		Día 0	Día 5	Día 11	Día 0	Día 5	Día 11
TP (s)	(20-27)	22,0 ±1,8	20,7 ±1,3	21,9 ±0,9	23,1 ±2,6	21,6 ±2,3	23,0 ±1,6
TTPa (s)	(19-37)	25,1 ±1,7	24,9 ±1,8	27,0 ±4,2	27,2 ±2,0	27,0 ±1,3	26,6 ±1,3
PLAQUETAS (x10 <sup>3</sup> /μl)	(100-800)	432,7 ±49	524,8 ±187	471,5 ±4	462,3 ±101	617,5 ±294	393,8 ±74

**Tabla 20. Resultados parámetros bioquímicos (n=10; Media ±DS)**

	Valores de referencia	Etamsilato			Placebo		
		Día 0	Día 5	Día 11	Día 0	Día 5	Día 11
Urea (mg/dl)	(20-60)	27,0 ±8,9	22,7 ±9,0	23,8 ±10,5	20,3 ±3,9	<i>13,5 ±5,8</i>	<i>17,8 ±5,4</i>
AST (U/L)	(43-127)	55,7 ±10,7	53,3 ±6,4	57,3 ±7,1	62,3 ±4,2	57,3 ±9,0	62,3 ±8,1
ALP (U/L)	(27-107)	<i>398,5 ±126</i>	<i>379,3 ±93</i>	<i>395,7 ±89,4</i>	<i>409,8 ±83,9</i>	<i>396,0 ±53,3</i>	<i>510,3 ±71,0</i>
GLDH (U/L)	(<31)	<i>44,0 ±30,1</i>	<i>37,7 ±22,8</i>	<i>45,7 ±33,9</i>	17,3 ±2,1	<i>34,5 ±29,9</i>	18,7 ±3,6
GGT (U/L)	(15-39)	24,7 ±12,3	18,7 ±1,8	20,2 ±7,5	31,8 ±15,4	15,8 ±6,1	40,3 ±49,3
Creatinina (mg/dl)	(1-2)	1,1 ±0,2	1,0 ±0,2	1,0 ±0,2	1,0 ±0,1	1,0 ±0,1	1,0 ±0,1
CK (U/L)	(105-409)	120,8 ±36,8	141,0 ±112	122,0 ±39,7	161,8 ±47,9	152,8 ±22,9	291,0 ±286
Bilirrubina total (mg/dl)	(0,01-0,47)	0,1 ±0,0	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	0,1 ±0,0	0,2 ±0,1	0,3 ±0,1
Cloruros (mmol/L)	(97-111)	100,2 ±1,0	99,8 ±1,2	100,3 ±2,2	97,1 ±0,1	99,4 ±1,9	100,1 ±1,4
Calcio (mg/dl)	(9,7-12,4)	10,0 ±0,2	9,9 ±0,2	10,2 ±0,3	10,1 ±0,3	9,7 ±0,5	10,3 ±0,3
Sodio (mmol/L)	(132-152)	139,0 ±3,5	139,5 ±3,9	138,0 ±3,6	140,8 ±2,2	139,3 ±2,9	138,8 ±4,1
Potasio (mmol/L)	(3,9-5,8)	4,8 ±0,2	4,7 ±0,3	4,5 ±0,3	4,5 ±0,1	4,7 ±0,3	4,2 ±0,5
Albúmina (g/dl)	(3-3,6)	4,2 ±0,3	4,1 ±0,4	4,1 ±0,2	4,0 ±0,2	4,1 ±0,2	4,1 ±0,1

*Valores en cursiva están fuera del rango de referencia.*

Figura 23. Representación gráfica de la evolución de los parámetros hemostáticos (Media±DS)

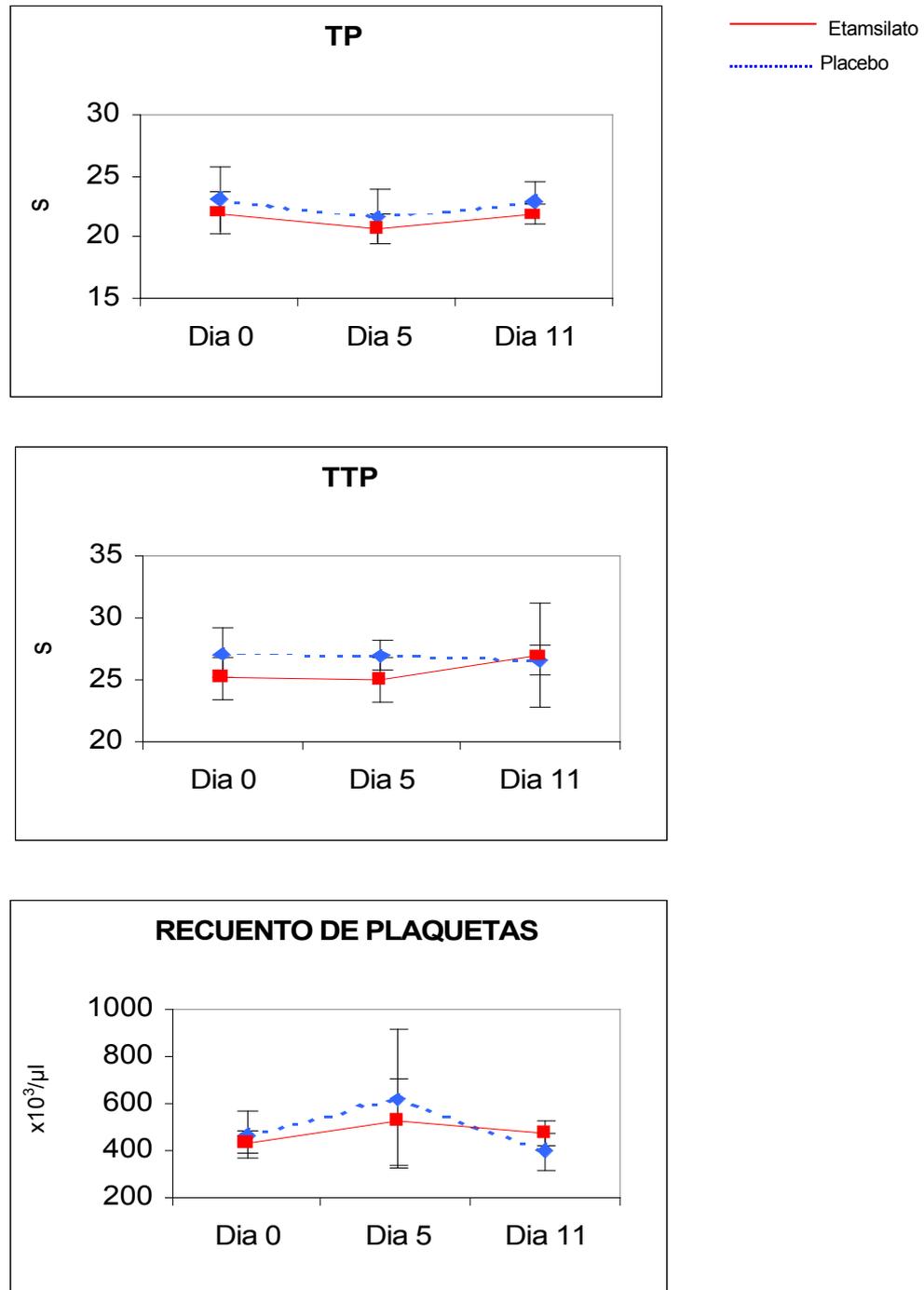
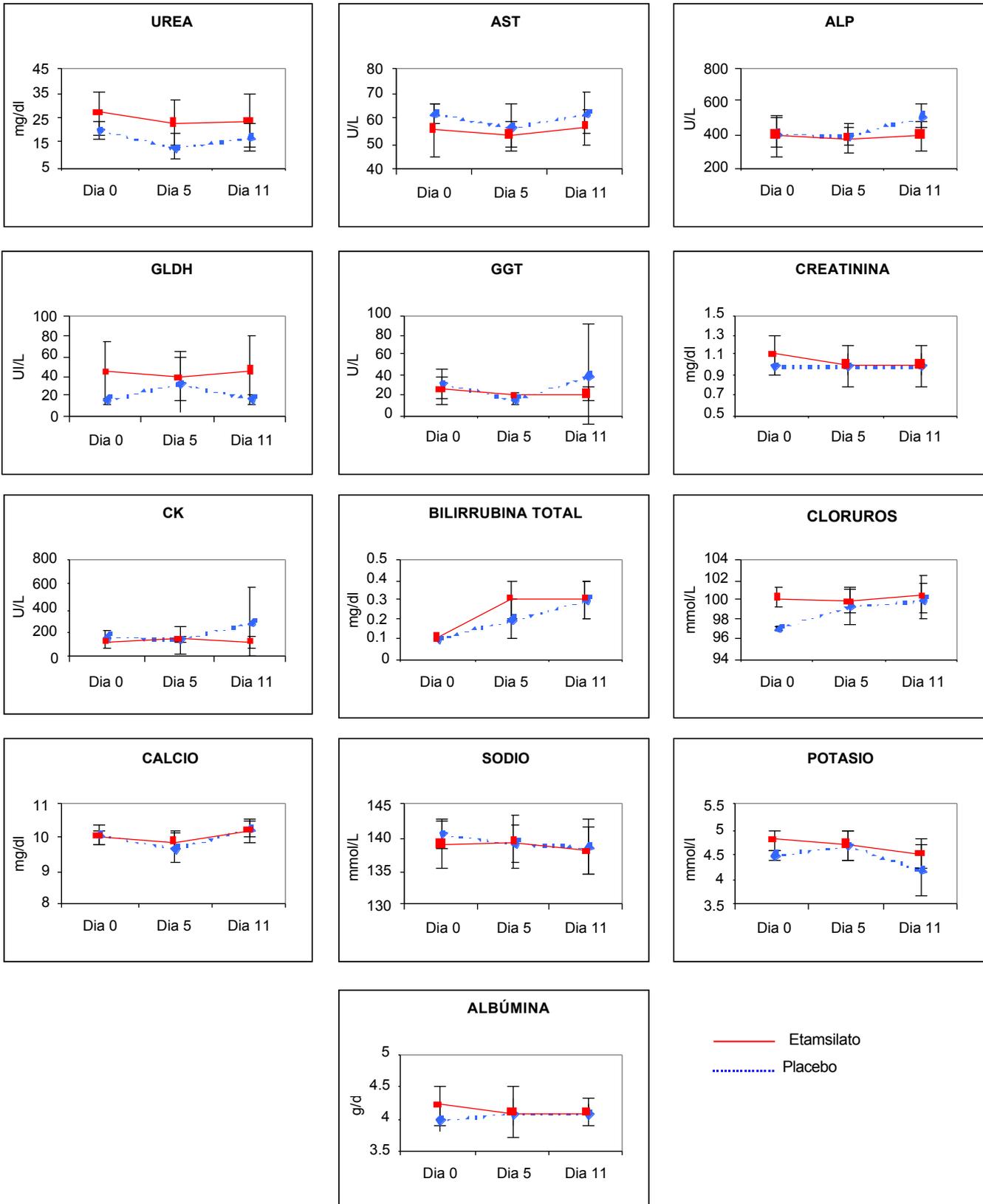


Figura 24. Representación gráfica de la evolución de los parámetros bioquímicos (Media±DS)



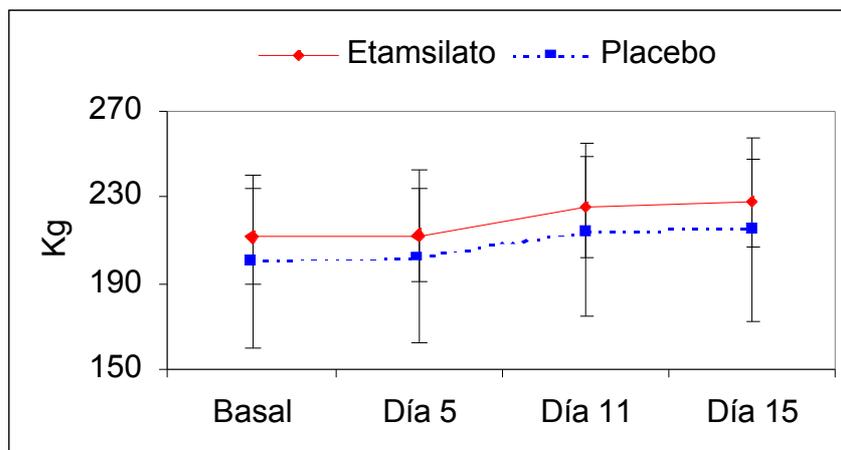
### 5.2.1.3 Evolución del peso de los animales

El peso medio de los animales aumentó a lo largo del estudio de forma paralela en ambos grupos (Ver **Tabla 21** y Figura 25). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los animales en ninguno de los días de pesaje durante el estudio y el período post tratamiento (días -2 (basal), 5, 11 y 15). Tampoco se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso del día 1 al 11 ni del 1 al 15 entre ambos grupos, por lo que no puede atribuirse efecto alguno del etamsilato sobre este parámetro.

**Tabla 21. Evolución del peso (kg) de los animales (n=10) en ambos grupos y ganancia de peso del día 1 al 15 (Media ±DS)**

Grupo	Basal	Día 5	Día 11	Día 15	Incremento de peso
<b>Etamsilato</b>	211,3 ±22,7	212,2 ±21,4	225,0 ±23,3	227,2 ±20,9	15,8 ±2,9
<b>Placebo</b>	199,5 ±40,5	202,0 ±39,9	213,8 ±40,1	214,3 ±42,3	14,8 ±3,6

**Figura 25. Representación gráfica de la evolución del peso de los animales (Media±DS)**



### **5.2.2 Tolerancia local**

#### **5.2.2.1 Estado de los animales. Inspecciones clínicas**

Durante el estudio de la tolerancia local todos los animales permanecieron clínicamente sanos, sin mostrar alteración alguna a nivel sistémico ni tampoco tumefacción o calor en el punto de inoculación que pudiera ser indicativa de una lesión o inflamación tisular.

#### **5.2.2.2 Niveles de CK**

Como parámetro más sensible respecto al grado de destrucción tisular, los resultados de la determinación de CK en plasma tras la administración IM de etamsilato o suero fisiológico se resumen en la Tabla 22 y la Figura 26.

**Tabla 22. Niveles de CK (UI/L) tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg de etamsilato o suero fisiológico por vía intramuscular en terneros (Media  $\pm$ DS)**

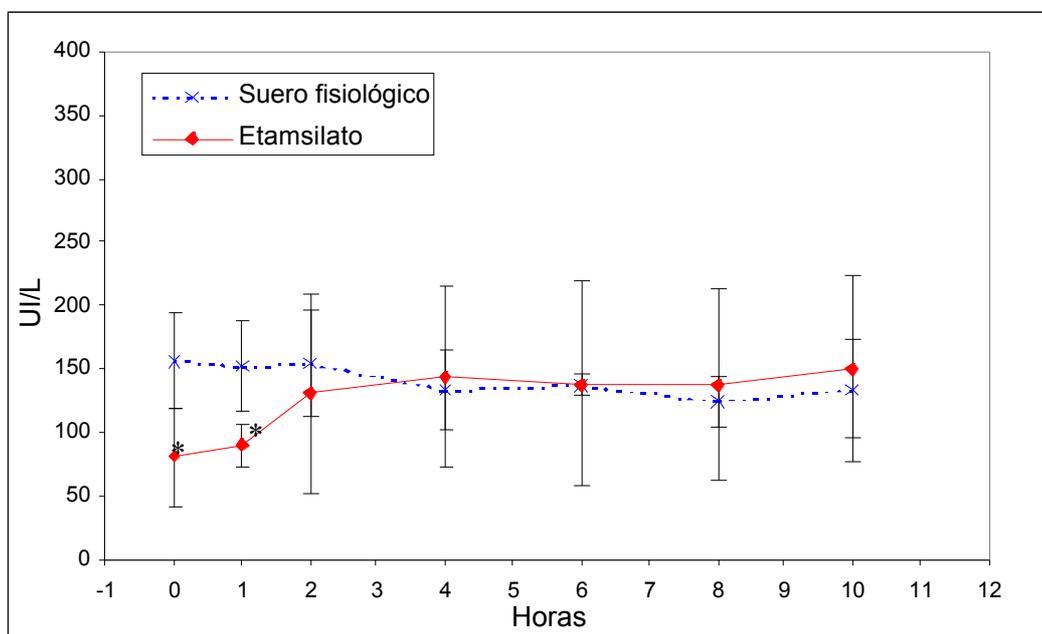
Horas	ETAMSILATO (n=6)	SUERO FISIOLÓGICO (control negativo) (n=3)
0	81,3 $\pm$ 39,1 *	156,0 $\pm$ 37,6 *
1	90,6 $\pm$ 16,6 *	153,0 $\pm$ 36,0 *
2	131,5 $\pm$ 78,3	154,3 $\pm$ 42,2
4	144,3 $\pm$ 71,1	134,3 $\pm$ 31,7
6	137,8 $\pm$ 80,2	137,7 $\pm$ 8,7
8	137,7 $\pm$ 74,6	125,3 $\pm$ 20,4
10	149,8 $\pm$ 73,9	134,5 $\pm$ 38,9

Valores con asterisco (\*) muestran diferencias significativas del tratamiento con etamsilato respecto al control negativo (P<0,05).

No se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con etamsilato y el control en cuanto a las concentraciones plasmáticas de CK a lo largo del tiempo ni en

cuanto a los valores de  $AUC_{0-10h}$  ( $1339,4 \pm 691$  para el grupo etamsilato frente a  $1481,8 \pm 314$  para el suero fisiológico). Tan sólo en los valores basales y los correspondientes a 1 h tras la administración se observaron diferencias estadísticamente significativas que, sin embargo, correspondieron a valores de CK inferiores en el grupo tratado respecto al grupo control.

**Figura 26. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de CK tras la administración IM de Etamsilato o Suero Fisiológico (Media**



**±DS)**

Valores con asterisco (\*) muestran diferencias significativas del tratamiento con etamsilato respecto al suero fisiológico ( $P < 0,05$ ).



### **5.3 EFICACIA**

#### ***5.3.1 Estado general de los animales***

En los controles previos a cada una de las fases experimentales se realizaron exámenes físicos de los animales así como extracciones sanguíneas para determinar los parámetros hematológicos, hemostáticos y bioquímicos más habituales. Todos los animales se encontraron en perfectas condiciones en ambos controles. Durante las fases experimentales tampoco se detectó incidencia alguna en el estado general de los animales.

#### ***5.3.2 Parámetros hemostáticos***

Los valores de los parámetros hemostáticos del grupo Etamsilato están representados en la Tabla 23. Los valores correspondientes al grupo Placebo se encuentran en la Tabla 24. Los porcentajes de variación de estos parámetros en ambos grupos se encuentran representados en la Figura 27.

La evolución de los parámetros hemostáticos no mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0,05$ ). Ambos tratamientos experimentaron una ligera disminución del TP y del TTPa, aunque no de forma significativa. Las plaquetas, que tendieron a aumentar (5%) en el grupo Etamsilato y en el Placebo a disminuir (-6,5%), tampoco mostraron diferencias significativas ( $P=0,216$ ). En este último parámetro se observa una gran variabilidad en los resultados en ambos grupos.

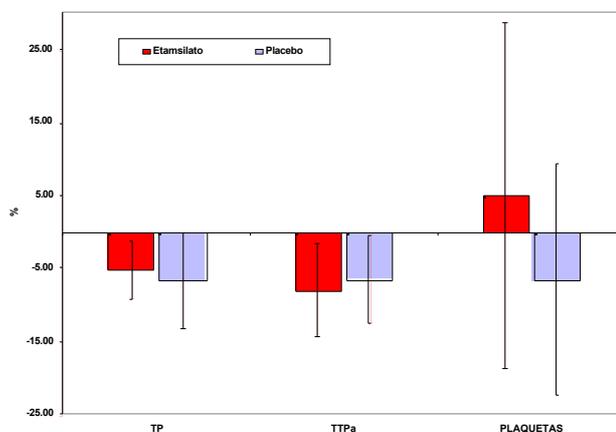
**Tabla 23. Animales grupo Etamsilato. Resultados de los parámetros hemostáticos previo y posterior a la administración (n=10; Media  $\pm$ DS)**

PARÁMETRO	Previo	Posterior	Diferencia	%Dif.
TP (s)	23,10 $\pm$ 1,9	21,87 $\pm$ 1,4	-1,23 $\pm$ 1,0	-5,14 $\pm$ 4,0
TTPa (s)	28,23 $\pm$ 2,3	25,99 $\pm$ 2,7	-2,24 $\pm$ 1,8	-7,94 $\pm$ 6,2
PLAQUETAS ( $\times 10^3/_l$ )	378 $\pm$ 99	388 $\pm$ 95	+10 $\pm$ 86,8	5,03 $\pm$ 23,7

**Tabla 24. Animales grupo Placebo. Resultados de los parámetros hemostáticos previo y posterior a la administración (n=10; Media  $\pm$ DS)**

PARÁMETRO	Previo	Posterior	Diferencia	%Dif.
TP (s)	23,30 $\pm$ 2,4	22,35 $\pm$ 1,4	-0,95 $\pm$ 1,5	-3,63 $\pm$ 6,6
TTPa (s)	28,90 $\pm$ 1,9	26,97 $\pm$ 1,9	-1,93 $\pm$ 1,9	-6,44 $\pm$ 6,1
PLAQUETAS ( $\times 10^3/_l$ )	393 $\pm$ 58	365 $\pm$ 68	-27 $\pm$ 58,1	-6,54 $\pm$ 15,7

**Figura 27. Porcentaje de variación de los parámetros hemostáticos 2h tras el tratamiento con etamsilato o placebo (Media  $\pm$ DS)**



### 5.3.3 Tiempos de sangría

El TS de cada determinación quedó establecido como la media de los tiempos válidos. En la mayoría de los casos las cuatro incisiones practicadas sangraron satisfactoriamente y los cuatro tiempos obtenidos fueron considerados como válidos. En todos los casos, el valor del TS se obtuvo de un mínimo de dos determinaciones.

Los TS previos y posteriores a la administración de los tratamientos con sus variaciones se encuentran resumidos en la **Tabla 25** y las Figuras 28 y 29.

**Tabla 25. Tiempos de Sangría (s) previo y 2h posterior a la administración de los tratamientos (Media ±DS)**

TRATAMIENTO	PREVIO	2h POSTERIOR	DIFERENCIA	% DE DISMINUCIÓN
<b>Etamsilato n=10</b>	164,2 ±40,4	130,3 ±20,2 *	33,9 ±50,4	16,3 ±24,2
<b>Placebo n=10</b>	141,3 ±35,1	124,7 ±37,9	17,2 ±40,7	10,3 ±26,8

Valores con asterisco (\*) muestran diferencias significativas con respecto al valor previo (P<0,05).

#### 5.3.3.1 *Grupo Etamsilato*

Los valores previos oscilaron entre 118 y 256 segundos, con una media de 164 segundos. Los valores posteriores oscilaron entre 104 y 153 segundos (130 segundos de media). Estos resultados muestran una disminución del TS de 34 segundos que equivalen, en porcentaje, a una reducción del 16,26% sobre los valores basales. Esta reducción es estadísticamente significativa (P=0,029).

Individualmente se observaron resultados variables, de forma que el TS de tres animales disminuyó en un porcentaje superior al 30%, en cinco animales entre el 10 y el 20%, y en los dos animales restantes se produjo un ligero incremento del TS. Estas modificaciones del TS muestran una correlación significativa (P=0,003) con los valores

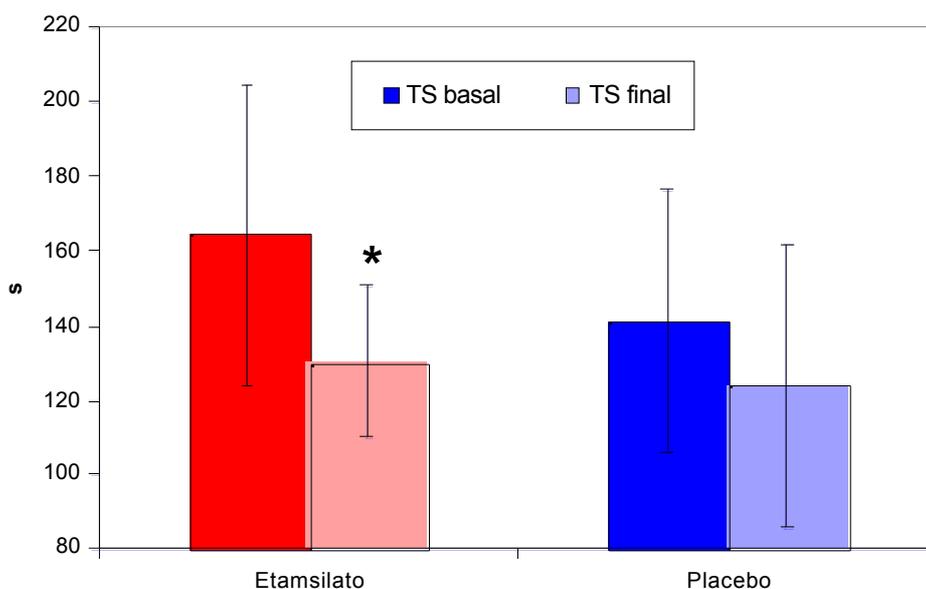
iniciales ( $R: 0,83$ ;  $R^2:0,69$ ), de manera que a mayor TS inicial se observa un mayor porcentaje de reducción.

### 5.3.3.2 Grupo Placebo

Los valores previos oscilaron entre 111 y 223 segundos, con una media de 141 segundos. Los valores posteriores oscilaron entre 69 y 181 segundos (media de 134 segundos). En promedio, el resultado es de una disminución en el TS de 17 segundos (10,37%). Sin embargo, a diferencia del grupo tratado con etamsilato, estas variaciones no alcanzaron significación estadística alguna.

Se observó una notable variabilidad individual, que en 5 animales supuso una disminución del TS en un porcentaje superior al 10% mientras que otros 4 experimentaron aumentos en el TS desde un 5 a un 25%. Por otra parte, a diferencia del grupo etamsilato, el porcentaje de reducción observado individualmente no estuvo correlacionado con la magnitud de los valores iniciales.

**Figura 28. Valores de TS basal y 2h tras el tratamiento con etamsilato o placebo (Media  $\pm$ DS).**

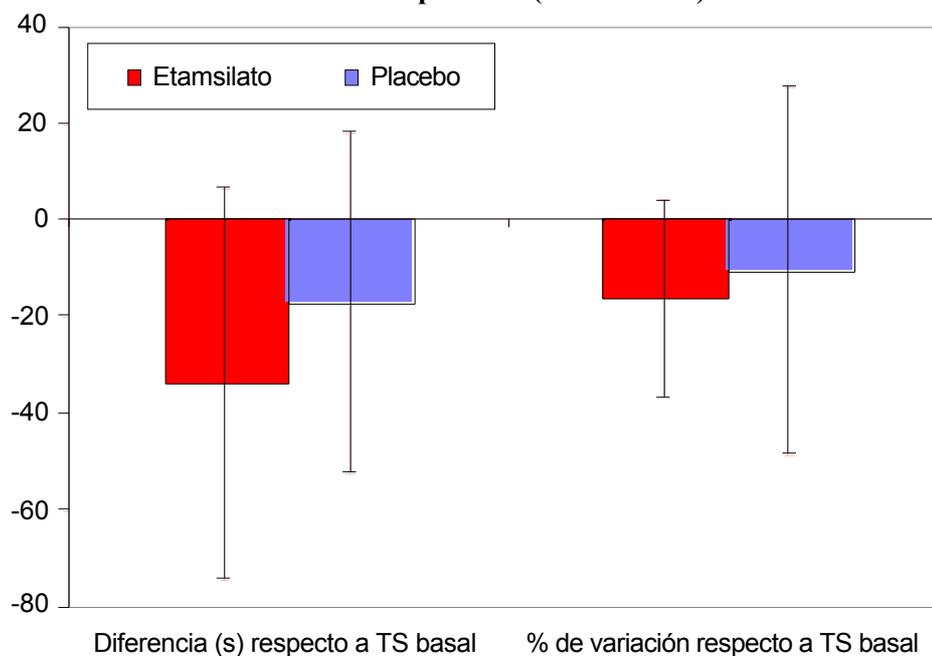


Valores con asterisco (\*) muestran diferencias significativas respecto al valor inicial ( $P<0,05$ ).

### 5.3.3.3 Diferencias entre tratamientos

A pesar de haberse producido un descenso estadísticamente significativo del TS en el grupo tratado y no así en el grupo control, las diferencias en el porcentaje de reducción del TS entre ambos tratamientos no alcanzaron la significación estadística. Aún así, en la Figura 29 puede apreciarse una tendencia del grupo etamsilato a acortar el TS en mayor medida que el grupo placebo.

**Figura 29. Variación de los valores del TS 2h tras el tratamiento con etamsilato o placebo (Media  $\pm$ DS).**





# Capítulo 6

# DISCUSIÓN



## **6 DISCUSIÓN**

### **6.1 Farmacocinética**

El estudio farmacocinético en bóvidos ha permitido confirmar las similitudes cinéticas del etamsilato en esta especie con las descritas en diferentes especies animales y en el hombre. Tal como se describe en la revisión bibliográfica, Marignan y cols. (1967) observaron una eliminación muy rápida a través de la orina en ratones, que fue confirmada en ratas por Esteve y Roser (1975), observando la eliminación, de la práctica totalidad del producto administrado, en la orina de 24 horas, al igual que observó Chanal (1969) en conejos. Las investigaciones de Yamboliev y cols. (1992) permitieron conocer además que su absorción por vía oral en rata era también muy rápida y que su distribución tisular era baja puesto que su carácter hidrófilo le impedía atravesar fácilmente las membranas. Finalmente Martin en 1983 confirmó que, en el hombre, la biodisponibilidad oral o intramuscular era también muy alta y la eliminación era asimismo rápida sin observarse tampoco metabolito alguno en orina. Sin embargo, tan sólo se dispone de un estudio farmacocinético detallado, que se realizó en el hombre (Martin 1983) y, dado que esta especie es también la más estudiada desde el punto de vista de la eficacia, es oportuno establecer algunas comparaciones farmacocinéticas entre los resultados obtenidos en el presente estudio en bóvidos y el realizado en el hombre.

### **6.1.1 Administración intravenosa**

El perfil farmacocinético encontrado tras la administración intravenosa muestra dos fases bien diferenciadas. Una primera fase en la que predominan los fenómenos de distribución y otra en que predominan los de eliminación, siguiendo un modelo bicompartimental y obteniéndose dos pendientes bien definidas. Por tanto, el equilibrio entre las concentraciones plasmáticas y tisulares no es inmediato y se precisa un cierto tiempo de distribución antes de alcanzar el equilibrio. No obstante, el perfil de concentraciones no se aleja demasiado a lo que sería un modelo monocompartimental dado que la fase inicial de distribución es muy breve. De hecho, el punto de inflexión entre ambas pendientes se alcanzaría aproximadamente al cabo de tan sólo una hora tras la administración y, a partir de este punto, predomina la eliminación y se observa una fase monoexponencial. Este perfil es característico de fármacos que difunden con rapidez a los órganos bien irrigados en los que alcanzan un equilibrio de forma más o menos inmediata, pero sin llegar a difundir a los tejidos periféricos. En este sentido, Yamboliev y cols. describieron en 1992 que el etamsilato muestra 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 encuentra principalmente en su forma ionizada a cualquier pH y, por tanto, tendrá dificultades para atravesar fácilmente las membranas y difundir a los tejidos poco vascularizados.

Al existir una correlación entre el coeficiente de partición, la facilidad para traspasar membranas y el Vd, especialmente en fármacos con coeficientes bajos, es esperable que estos parámetros sean también bajos para el etamsilato y que su distribución se limite al espacio intersticial (aproximadamente 180 ml/kg). De hecho, en el estudio realizado en humanos (Martin 1983) se obtuvo un valor de Vd en el hombre de 0,21 L/kg que es ligeramente superior al volumen del líquido extracelular en el hombre.

El volumen de distribución encontrado en el presente estudio es superior (0,44 L/kg), y se aproximaría más al volumen del total del agua corporal que, en general, viene a ser del orden del 60-70% de la masa corporal, si bien en rumiantes puede ser superior si se tiene en cuenta el efecto de la gran cantidad de contenido gastrointestinal (Martínez 1998b). Estos datos sugieren, en línea de lo dicho anteriormente, que el fármaco se distribuye en el agua corporal y no queda retenido en ningún tejido periférico.

Según Martínez (1998b), las diferencias en Vd inter-especies pueden deberse a diferencias en la composición corporal (porcentaje de grasa o proteína, tamaño de los órganos y flujo sanguíneo en los diferentes órganos) así como a diferencias de tipo fisiológico. Una de ellas pudiera ser la existencia del rumen y preestómagos en los bóvidos en los que el fármaco podría difundir y quedar atrapado en su contenido. En el caso de los animales monogástricos el tamaño del contenido intestinal es de aproximadamente el 1% del peso vivo mientras que en los rumiantes es de aproximadamente el 15%, aumentando así el volumen de líquido en el que se puede diluir el fármaco y, por tanto, disminuyendo su concentración en plasma. Este fenómeno provoca un importante incremento del Vd y fue descrito ya por diversos autores para otros fármacos (Baggot 1995, Bradley y cols.1982, Martínez 1998b), siendo un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de comparar las dosis y pautas utilizadas en el hombre y en esta especie animal.

Por otra parte, como ya se ha dicho, el Vd puede verse alterado en función del grado de unión a las proteínas plasmáticas. Sin embargo, no existe información del grado de unión del etamsilato a las proteínas plasmáticas en ninguna especie animal. Aún así, pequeñas diferencias en el grado de unión a proteínas en un fármaco polar con un Vd moderado, como en el caso del presente estudio, tienen poca incidencia en cuanto a variaciones de dicho Vd. En general, según Martínez (1998c), la unión a proteínas debe tenerse en cuenta cuando es elevada, lo que es poco probable en un fármaco polar y de rápida eliminación como es el etamsilato.

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio se ha podido corroborar que, en la especie bovina, la eliminación, al igual que en otras especies como el ratón, rata, conejo u hombre, es también muy rápida (Marignan y cols. 1967, Chanal 1969, Esteve y Roser 1975, Martin 1983). Como medidas de eliminación del fármaco del organismo, se han obtenido valores de Cl de 0,21 L/h.kg y de  $T_{1/2}$  de alrededor de 1,5 h lo que sería coherente con una escasa unión a las proteínas plasmáticas que, en línea de lo descrito para otras especies, permitiría una eliminación rápida por filtración glomerular y, dada su polaridad, una escasa reabsorción tubular. Asimismo, la escasa capacidad de distribución a través de los tejidos y la rápida eliminación confirmada también en bóvidos apuntan hacia una escasa metabolización, al igual que se ha descrito en especies de laboratorio en las que se eliminaba el etamsilato inalterado predominantemente por vía renal.

Por otra parte, en el estudio de Martin (1983) en el hombre se pudo calcular un valor de Cl de 0,074 L/h.kg que es del orden del 35% del obtenido en bóvidos. Por lo tanto, salvando las distancias fisiológicas de ambas especies así como otras posibles diferencias en cuanto a edad, peso, etc., la eliminación en la especie bovina (o al menos en terneros jóvenes) podría ser más rápida aún que la observada para el hombre.

Hay que destacar que la trascendencia del Vd y del Cl en el caso del etamsilato no viene dada por su mayor o menor posibilidad de acceso a su lugar de acción, ya que este es, sin duda, algún componente de la sangre o del endotelio y, por tanto, el acceso al lugar de acción está garantizado, al menos tras la administración IV. Sin embargo, el hecho de mostrar un Vd más elevado en esta especie, junto con un Cl también más elevado sólo puede traducirse en una menor presencia del fármaco en sangre, por lo que las concentraciones plasmáticas deben ser menores y desaparecer antes y, por tanto, deben reflejarse en los valores de AUC. De hecho, la magnitud de las concentraciones plasmáticas es mucho mayor en humanos y, expresados en AUC, son de más del doble que lo observado en bóvidos (111 vs 37,6  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  respectivamente) tras la

administración IV. Si aplicamos una simple corrección por la dosis ajustando los datos de Martin a la dosis de 7,5 mg/kg los valores se acercan algo (100,4 vs 37,56 µg.h/ml), pero siguen siendo muy dispares y de más del doble en el caso del hombre respecto a los bóvidos.

No se dispone de datos farmacocinéticos concretos en otras especies que nos permitan comparar la magnitud de las concentraciones plasmáticas halladas ni otras posibles variaciones en el Vd o Cl. Dado que no se ha descrito una correlación clara entre las concentraciones plasmáticas de etamsilato y su efecto antihemorrágico, queda por definir si las concentraciones halladas en este estudio en los diferentes tiempos son las apropiadas para demostrar su eficacia, lo cual se comentará más adelante. Es pertinente recordar, sin embargo, que según diversos autores (Esteve y cols. 1959, Laporte y Esteve 1967, Chanal 1969) el efecto antihemorrágico máximo del etamsilato no se observa inmediatamente tras la administración intravenosa del fármaco, sino entre 1 y 3 horas después, momento en que las concentraciones plasmáticas son ya mucho más bajas que las iniciales. Por otra parte, la magnitud y duración del efecto sí que han sido directamente relacionadas con la magnitud de la dosis administrada.

### ***6.1.2 Administración intramuscular***

El perfil de concentraciones observadas tras la administración IM muestra una breve fase en la que predominarían los fenómenos de absorción alcanzándose la  $C_{max}$  a las 1,3 horas posteriores a su administración. Esta fase de absorción muestra niveles plasmáticos muy variables, lo que estaría de acuerdo con una administración IM en la que el fármaco se distribuye primero en los espacios intersticiales y después difunde a través de las membranas hasta la sangre. Lógicamente, este fenómeno no existe cuando la administración es IV. En este sentido, dada la poca facilidad de atravesar membranas del etamsilato debido a tratarse de un fármaco muy polar, la absorción a partir del tejido muscular será más dificultosa y se verá forzado a progresar, en buena medida, a través de

los espacios intersticiales hasta alcanzar el endotelio de algún capilar sanguíneo. Este comportamiento no difiere del reportado por Martin (1983) en humanos tras la administración IM, si bien en el hombre las concentraciones máximas fueron más elevadas.

A partir del  $T_{max}$  la evolución del perfil de concentraciones plasmáticas no difiere de lo que ya se ha descrito en la vía IV, predominando el proceso de eliminación, que sería también muy rápido por esta vía. Como era de esperar, las concentraciones plasmáticas máximas son mucho menores respecto a las observadas tras la administración IV ya que, por vía IM existe una absorción que tiene lugar de forma simultánea, en mayor o menor medida, a la distribución y eliminación, mientras que tras la administración IV todo el fármaco se encuentra ya en plasma desde el primer momento.

Sin embargo, atendiendo a los valores de AUC, se observa una muy alta biodisponibilidad, del mismo orden que la descrita por Martin (1983) en humanos. Esta gran biodisponibilidad, junto con el hecho de que la  $C_{max}$  se alcanza con rapidez, permite concluir que el etamsilato se absorbe rápida y extensamente desde el tejido muscular.

El resto de parámetros farmacocinéticos son muy similares a los observados tras la administración por vía IV. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas persisten elevadas durante más tiempo, lo cual podría traducirse en una eficacia también más persistente. El valor de MRT tras la administración IM es significativamente superior al observado tras la administración IV, lo cual, es coherente con la existencia de una fase de absorción que no existe en la vía IV. Aunque el valor de MAT, como medida del tiempo de absorción desde el músculo, es de sólo  $1,5 \pm 1$  horas, la proporción de MAT sobre el MRT es de aproximadamente el 50%, lo que sugiere que la velocidad de absorción condiciona la velocidad de distribución y en particular la de eliminación.

Al igual que tras la administración IV alguno de los resultados contrasta hasta cierto punto con lo observado en humanos, puesto que en el estudio de Martin (1983) las concentraciones máximas tras la administración IM fueron mucho mayores que en el presente estudio (30,5 vs 10,7  $\mu\text{g/ml}$ ) a pesar de que las dosis administradas fueran similares en ambos casos. Esta discrepancia no está relacionada con la biodisponibilidad de esta vía (que es muy alta en ambas especies), sino con lo descrito anteriormente respecto al CI, que es muy superior en terneros.

En conjunto, dada su alta biodisponibilidad, la vía IM parece adecuada para su utilización en bóvidos y, dada la mayor permanencia de niveles plasmáticos de etamsilato respecto a la administración IV, esta vía podría ser útil para mantener sus efectos durante más tiempo y, posiblemente, aumentar el intervalo entre administraciones.

El planteamiento del estudio farmacocinético fue el de caracterizar por primera vez la evolución de las concentraciones plasmáticas de etamsilato en la especie bovina con vistas a la influencia que el perfil cinético pudiera tener de cara a la eficacia clínica y a su tolerancia. Por lo tanto, y para evitar desviaciones sobre el objetivo general del presente trabajo, no se persiguió la realización de un estudio farmacocinético exhaustivo, que sería más pertinente en fármacos de nuevo desarrollo, ni desde el diseño del estudio ni desde el posterior análisis de los resultados. En este sentido se ha omitido el estudio farmacocinético a varias dosis que hubiera permitido estudiar la linealidad o no del comportamiento farmacocinético del etamsilato en la especie bovina. Tampoco se ha estudiado la farmacocinética a dosis reiteradas que hubiera podido definir la presencia o no de acumulación o de inducción enzimática por entender que este ejercicio merecería un estudio muy específico que queda fuera del ámbito de los objetivos del presente trabajo.

Un aspecto esencial que hay que definir a priori en cualquier estudio farmacocinético es la o las dosis a utilizar, que idealmente debieran coincidir con la dosis terapéutica. Sin

embargo, en el apartado de revisión bibliográfica ya se discute ampliamente la indefinición existente en este aspecto y las dispares dosis empleadas en la práctica. La inexistencia de otros estudios publicados en bovino hace aún más difícil la elección de una dosis concreta, puesto que las únicas referencias existentes son las de la práctica habitual en la clínica bovina o las empleadas en medicina humana y, aún así, sigue existiendo un rango muy amplio de posibles dosis terapéuticas. Debido a esta indefinición se ha optado por utilizar una dosis intermedia que actuara como representativa del comportamiento del fármaco en esta especie dentro de todo el rango terapéutico, lo cual, dada la poca información existente, ofrece una información muy importante de cara al estudio de eficacia. Sólo en el caso de que en un futuro pudiera existir una dosis terapéutica precisa y sólidamente establecida que variara substancialmente de la dosis considerada actualmente sería necesario validar o ampliar las conclusiones del presente estudio con un nuevo estudio farmacocinético a la dosis final.

En cuanto a la posible influencia de la reiteración de las dosis y de su frecuencia y pauta de administración, la información previa es aún más escasa, recomendándose generalmente su uso de una forma poco precisa y en función del tipo y evolución del proceso. En general, en la práctica clínica del vacuno suele utilizarse en dosis única previamente a una intervención quirúrgica u obstétrica que suele plantearse de urgencia, si bien sí pueden utilizarse dosis de recuerdo en el post operatorio. A pesar de esta indefinición, en vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, la elección de una única dosis parece suficiente dada la rápida eliminación del etamsilato y de su escasa metabolización, lo cual disminuye mucho las posibilidades de acumulación en el organismo. Estos dos fenómenos, ya descritos en otras especies (Marignan y cols. 1967, Chanal 1969, Martin 1983) y corroborados en bóvidos por el presente estudio, permiten asumir que, en el rango de dosis considerado y en una frecuencia de administración compatible con la práctica veterinaria, es muy improbable que se produzca una acumulación del fármaco en el organismo.

Por otra parte, el número de animales empleados fue el habitual en este tipo de estudios y, a tenor de los resultados, fueron suficientes para obtener un grado de dispersión en las concentraciones bastante razonable, aunque en el estudio de la farmacocinética tras la administración IM se observa una variabilidad elevada en la fase de absorción que posiblemente pudiera haberse paliado con la inclusión de un mayor número de animales. Por motivos prácticos, se han utilizado animales de unos cuatro meses de edad cuando lo más probable es que los pacientes habituales que reciben este fármaco sean vacas adultas en algún momento alrededor del parto. En este sentido, es probable que exista alguna variación en la capacidad de metabolización o de excreción renal en función de la edad de los animales que pudiera inducir alguna pequeña modificación en el perfil farmacocinético.

Finalmente, si bien no disponemos de datos sobre la excreción urinaria del etamsilato en bóvidos, nada parece indicar que la eliminación en esta especie sea diferente a la ya descrita para la rata, conejo u hombre. Por otra parte, la técnica analítica utilizada en este estudio fue validada únicamente para la detección del etamsilato inalterado, por lo que deberían hacerse estudios específicos para poder confirmar con seguridad la ausencia de metabolización en esta especie.

## **6.2 Tolerancia**

En el estudio de tolerancia podemos distinguir dos niveles, la tolerancia local, que pretende evidenciar los posibles efectos en el punto de inyección y la tolerancia general, que se orienta hacia los efectos del producto una vez ha alcanzado la circulación sistémica.

### **6.2.1 Tolerancia local**

En cuanto a la tolerancia local, los resultados del examen del punto de inoculación y, sobre todo, de la evolución de la CK plasmática han dejado bien claro que no se produce una irritación ni destrucción tisular significativa tras la aplicación del etamsilato. Observando la evolución de las concentraciones en ambos grupos a lo largo del tiempo, puede afirmarse que las diferencias iniciales encontradas en los valores basales y los correspondientes a 1 h tras la administración carecen de significación clínica alguna al corresponder a valores de CK inferiores en el grupo tratado respecto al grupo control.

Si bien es cierto que este estudio se ha realizado en una sólo administración y a la dosis terapéutica, al no existir el menor indicio de intolerancia local a la dosis utilizada en este

estudio, es poco probable que en un margen de sobredosificación razonable se pudieran evidenciar signos de intolerancia que pudieran tener alguna trascendencia clínica. Por otra parte, la aplicación de un volumen máximo de líquido en un mismo punto de aplicación condiciona la dosis a administrar, que a partir de un cierto volumen suele repartirse en dos puntos de inoculación siendo generalmente admitida la demostración de la tolerancia a dosis simple.

En cuanto a la administración intravenosa utilizada en el estudio de tolerancia general, no se ha observado alteración alguna en el punto de inoculación que pudiera representar algún indicio de irritación vascular o flebitis. Por lo tanto, al igual que la administración intramuscular, puede concluirse que la vía intravenosa es segura para la administración del etamsilato en el ganado vacuno. Estos resultados son asimismo coherentes con lo descrito en el apartado de revisión bibliográfica, en el que se comenta que no se han encontrado informes de posibles efectos adversos a nivel local tras su administración por cualquier vía en ninguna especie.

### ***6.2.2 Tolerancia sistémica***

Los resultados obtenidos en cuanto a la tolerancia a nivel sistémico siguen esta misma pauta, ya que no se ha detectado síntoma clínico alguno tras la administración al doble de la dosis más elevada de las descritas durante un largo período de tratamiento. Las pequeñas diferencias encontradas en alguno de los parámetros hematológicos estudiados (hemoglobina, HCM) no revisten mayor trascendencia, puesto que no se observa una evolución consistente a lo largo de la prueba. Por lo tanto, no pueden atribuirse a una posible toxicidad o intolerancia al producto, más aún cuando se mantuvieron siempre dentro de un rango de valores considerado como correcto.

Por otra parte, algunos de los parámetros bioquímicos mostraron valores fuera del rango óptimo (ALP y GLDH) si bien, como ya se ha comentado en el apartado de resultados,

este fenómeno es normal en terneros de corta edad. En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, por lo que tampoco cabe atribuir estas desviaciones al producto administrado. Al igual que en el caso de los parámetros hematológicos, no se observa una tendencia definida a lo largo del estudio que permitiera establecer una relación causal. Por otra parte, es necesaria una valoración conjunta de diversos parámetros analíticos y del estado general del animal para poder concluir la presencia de algún tipo de patología, en este caso de intolerancia o intoxicación. Todos estos resultados indican que el etamsilato es bien tolerado por la especie bovina, incluso a dosis muy superiores a las consideradas como terapéuticas y durante administraciones reiteradas.

Este estudio de tolerancia se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones oficiales vigentes en Europa para la demostración de la seguridad de los medicamentos. Debido a tratarse de un fármaco que en la práctica clínica a lo largo de muchos años no ha mostrado problemas de toxicidad en ninguna especie de destino incluido el hombre, no se consideró necesario llevar al extremo las condiciones en que se realizó el estudio. Se ensayó con el doble de la dosis máxima recomendada durante un período de 10 días, lo cual corresponde a un tiempo mucho más largo del habitual ya que, como se ha comentado anteriormente, en la práctica normal en vacuno se administraría a dosis única. Dados los buenos antecedentes del fármaco en todas las especies, no era previsible encontrar alteraciones significativas a estas dosis y pauta. Sin embargo, no se utilizaron dosis superiores que pudieran llegar a mostrar indicios de toxicidad, y por tanto permitieran establecer un índice terapéutico o un margen de seguridad máximo, puesto que dicho estudio precisaría de un enfoque toxicológico con técnicas histopatológicas y un elevado número de animales que constituirían un trabajo de excesiva complejidad para los objetivos del presente estudio. Por otra parte, al tratarse de un producto de administración individual por vía parenteral, la dosis a administrar puede calcularse en función de un peso aproximado y aplicarse con razonable precisión. Por ello, la

utilización del doble de la dosis constituye un margen de seguridad suficiente para la práctica clínica habitual.

El número de animales utilizado en este estudio es algo reducido (6 animales tratados y 4 controles) pero dentro de lo habitual en este tipo de estudios y, a la vista de la notable homogeneidad de los resultados, podemos confirmar la suficiencia de la cantidad de animales utilizados. Por otra parte, se utilizaron animales de unos 3 meses de edad que deberían ser mucho más sensibles a cualquier efecto nocivo que los animales adultos a los que principalmente va dirigido este medicamento. La utilización de animales jóvenes, si bien ya con rumen funcional, presenta numerosas ventajas de índole práctica al tiempo que nos sitúa en el peor caso posible para demostrar la tolerancia en esta especie, por lo que su utilización en este caso, con la salvedad de las alteraciones en ALP propias de la edad y ya comentadas, ofrece resultados perfectamente extrapolables a los animales plenamente adultos. En este sentido, dado que una buena parte del fármaco utilizado en el ganado vacuno se emplea en momentos cercanos al parto (cesáreas o distocias), hubiera sido interesante valorar la influencia del etamsilato sobre la reproducción y sobre el neonato. Sin embargo, el largo historial del etamsilato en esta utilización así como las grandes dificultades que estos estudios conllevarían en la especie bovina hacen de esta una cuestión poco prioritaria y, por supuesto, muy lejana a los objetivos del presente trabajo.

### **6.3 Eficacia**

El estudio de la eficacia no mostró alteración alguna en los parámetros hemostáticos estudiados (TP y TTPa), que disminuyeron ligeramente tanto en los animales tratados como en el grupo placebo, sin mostrar diferencia significativa alguna. Los valores encontrados en ambos parámetros (entre 20 y 30 segundos) se encuentran en línea con los valores descritos previamente en esta especie (Alstad y cols. 1985, Karges y cols. 1994). Por lo tanto, estos resultados confirmarían por una parte que el sistema hemostático de los animales utilizados en el estudio funcionaba correctamente y, por otro, que el etamsilato, al igual que ha sido descrito previamente en otras especies (Esteve y cols. 1959, Esteve y cols. 1960a, EMEA 1998), no tendría ningún efecto sobre la hemostasia secundaria, o coagulación de la sangre, en la especie bovina.

Por otra parte, el recuento de plaquetas en sangre se encontró dentro del rango considerado como normal, por lo que también en este aspecto el sistema hemostático de los animales utilizados se mostraba en condiciones fisiológicas normales. En cuanto a su evolución, se observaron ciertas diferencias que, si bien no llegaron a ser estadísticamente significativas, vale la pena comentar. Así, mientras que en el grupo tratado se observó, en promedio, un aumento del 5% en la concentración plaquetar, en el grupo placebo se observó una disminución del 6,5%. Como ya se ha dicho, dado que el rango de valores

fue muy amplio, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. Sin embargo, esta tendencia ha sido descrita también en otros estudios (Esteve y cols. 1960b y Esteve y cols. 1961) en que se observó un aumento de la concentración plaquetar del orden del 40% dos horas tras la administración de una dosis equivalente de etamsilato. Estos autores postulan que este fenómeno se debe exclusivamente a un aumento de las plaquetas circulantes y no a un aumento en la producción de plaquetas ya que no podría producirse un aumento significativo de la producción en tan sólo dos horas. Por otra parte, en nuestro estudio de tolerancia, en que se administraron dosis superiores durante varios días, no pudo detectarse tendencia alguna al aumento del recuento de plaquetas. A diferencia del estudio de eficacia y de los mencionados de Esteve y cols. (1960b y 1961), en nuestro estudio de tolerancia las muestras de sangre se tomaron previamente a las diferentes administraciones de etamsilato, por lo que sólo se puede observar el efecto remanente de las dosis correspondientes a los días anteriores. En vista de la ausencia de modificación alguna en este estudio, se confirmaría que el aumento en el recuento de plaquetas se debe a una movilización momentánea de las mismas, que se produciría inmediatamente tras la administración de una dosis del producto, pero sin ningún efecto duradero sobre su producción.

Por tanto, dada la falta de actividad del etamsilato sobre la hemostasia secundaria (sin influencias en cuanto a TP y TTPa), y más aún si hubiera algún efecto beneficioso sobre el número de plaquetas circulantes, su acción hemostática debería quedar en evidencia, al igual que se ha descrito en otras especies como el conejo o el hombre, mediante tests apropiados para la evaluación de la hemostasia primaria. Entre estos tests destaca el TS por su amplia utilización en el desarrollo clínico del etamsilato en animales de laboratorio y en el hombre.

En nuestro estudio, la administración única de la dosis máxima preconizada de etamsilato produjo una disminución del TS que, en promedio, fue del 16% respecto a sus valores basales y alcanzó una clara significación estadística. Los resultados obtenidos mostraron

una gran variabilidad, llegando incluso a observarse un aumento del TS en dos individuos, si bien es interesante destacar la significativa correlación existente entre los valores iniciales y el porcentaje de reducción del TS. Esta última observación se situaría en consonancia con lo descrito por Cornet (1969) en el hombre, según el cual, a TS inicial más largo, mayor porcentaje de disminución tras la administración del etamsilato, e incluso podría tener relación con lo descrito por Raby y Coupier (1965) también en el hombre, en la línea de que sólo se producirían descensos significativos del TS cuando se partiera de un TS previamente alargado por otras causas.

Por otra parte, la magnitud de la reducción del TS está, en promedio, lejos de lo descrito para el conejo o el hombre y que llega a ser de hasta el 50% (Esteve 1960a, Laporte 1961, Esteve y cols. 1959, Canal 1964, Laporte y Esteve 1967). Ello plantea la duda de la significación clínica que una reducción del 16% del TS pudiera tener en la práctica, si bien cabría considerar la posibilidad de obtener un mayor efecto en aquellos animales que, a priori, tendrían más dificultades para el mantenimiento de una correcta hemostasia.

En el grupo placebo se observaron resultados muy variables habiendo tantos animales tendentes a la disminución como al alargamiento del TS. En promedio se observó una disminución del TS respecto a los valores iniciales de aproximadamente el 10%. Sin embargo, como era previsible, esta variación no alcanza la significación estadística ni se correlaciona significativamente con los valores iniciales. Dada la gran variabilidad de los resultados, las diferencias en cuanto a los porcentajes medios de disminución del TS entre el grupo tratado y el placebo no alcanzaron la significación estadística. Para ello, pudiera haber sido necesario utilizar un mayor número de animales que pudiera contrarrestar la variabilidad encontrada. Sin embargo, la detección de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos no presupondría necesariamente una utilidad clínica en la práctica de rutina a no ser que estas fueran de una cierta magnitud o que contribuyeran a paliar notoriamente los eventuales defectos hemostáticos de un determinado paciente que fuera a ser intervenido.

Dada la inexistencia de literatura científica respecto al uso del etamsilato en bóvidos, la primera y más inmediata hipótesis a considerar a la vista de la discreta disminución del TS y a la poca diferencia observada, en promedio, respecto al placebo, sería que el etamsilato ejerciera una actividad menor en esta especie a la observada en el conejo o en el hombre. Sin embargo, es razonable pensar que la amplia utilización de este fármaco en la clínica bovina, en diversos países y durante más de 30 años, responda a la observación empírica de un efecto positivo y clínicamente detectable en la práctica, por lo que deberían primero revisarse las posibles deficiencias o limitaciones del protocolo utilizado en este estudio, para así poner en perspectiva las posibles conclusiones que se puedan sacar de estos resultados.

Al igual que en los estudios anteriormente comentados, para la demostración de la eficacia del etamsilato se partió de la base de un uso extendido durante décadas en la clínica del ganado bovino. Por lo tanto, se disponía a priori de una dosis, o rango de dosis, ya conocido y aceptado generalmente como eficaz. Por otra parte, a pesar de no existir ningún estudio conocido de eficacia en bóvidos, se asumió que lo observado por diversos autores en conejo y en el hombre en cuanto a una reducción importante del TS (Esteve y cols. 1959, Esteve 1960a, Canal 1964, Laporte y Esteve 1967 o Vinazzer 1980) debería confirmarse también en esta especie utilizando pautas y protocolos similares. La confirmación de este comportamiento en bóvidos evidenciaría una reducción en la tendencia al sangrado en esta especie, en animales sin una patología previa, que justificaría su utilidad clínica y que abriría la puerta a estudios clínicos confirmatorios, a nivel de campo, con un diseño experimental muy diferente al empleado en el presente trabajo.

Por ello, no se pretendió iniciar un proceso de titulación de dosis en busca de la dosis óptima para esta especie, sino confirmar la eficacia de lo ya realizado habitualmente a nivel clínico y, por ello, se escogió **la dosis más alta de las utilizadas** comúnmente.

Por otra parte, la práctica habitual en bovino pasa por la **administración a dosis única**, lo cual nos ha llevado a imitar esta pauta de administración. Si bien los diseños experimentales utilizados en las publicaciones más tempranas de la eficacia del etamsilato no están siempre descritos con detalle, en diversas ocasiones se ha descrito que la administración de una única dosis fue eficaz para la reducción del TS en conejo (Esteve y cols. 1960a, Laporte 1961, Laporte y Esteve 1967, Esteve y cols. 1968) y hombre (Esteve y cols. 1959), y redujo el sangrado en heridas estándar en cerdo (Deacock y Birley 1969).

En cuanto a otras posibles limitaciones cabe destacar que el **método utilizado** para valorar el efecto no es puramente clínico, en el sentido estricto del control del sangrado en procesos patológicos o intervenciones obstétricas o quirúrgicas, sino que se ha fundamentado todo el estudio en un modelo de sangrado basado en el TS. Tal como se ha comentado en la revisión bibliográfica, se ha descrito que el TS, utilizado como test de “screening”, no es un buen predictor del sangrado durante una intervención quirúrgica (Hathaway y Goodnight 1993c). Sin embargo, en estudios experimentales controlados, ha demostrado ser un método válido que permite constatar diferencias respecto a otros tratamientos o respecto a un grupo control. Todo apunta a que el etamsilato ejerce su acción sobre la hemostasia primaria, por lo que el TS es un test de elección y ha sido utilizado con éxito por diversos autores para demostrar la eficacia de diversos fármacos (entre ellos la del etamsilato en conejo y en el hombre). Dada la intrínseca variabilidad del método, posiblemente, de haber contado con un **número mayor de animales** hubiera sido más fácil detectar diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control. Sin embargo, tal como ha sido comentado, más allá de la estadística los resultados obtenidos no muestran, en promedio, una reducción del TS en una proporción que pudiera considerarse como clínicamente significativa. La magnitud de esta reducción y la significación que pueda tener una reducción promedio de diversos animales sanos es la mayor dificultad para establecer un porcentaje de eficacia. Como factor complicante podría ponerse en duda la necesidad, o incluso la conveniencia, de reducir el tiempo de

sangría en aquellos animales en que ya es suficientemente corto, frente a la indudable conveniencia de reducirlo en la mayor medida posible en aquellos animales que presenten algún tipo de dificultad en la hemostasia primaria. La respuesta a este planteamiento excede al presente trabajo y precisaría de un diseño experimental específico, pero los resultados obtenidos en el grupo tratado, en que a mayor TS basal se produjo un mayor porcentaje de reducción, podrían apuntar un comportamiento del etamsilato orientado hacia esta posibilidad.

Por otra parte, hay que tener en cuenta los estudios realizados por Raby y Coupier 1965, en los que muestran que la actividad del etamsilato a 37°C es mucho menor que a 30°C, lo que justificaría su mayor eficacia en hemorragias externas. No hay referencias más modernas respecto a este fenómeno, si bien, si tenemos en cuenta que la temperatura rectal fisiológica de los bóvidos (38,5°C) (Fraser y Mays 1986) es superior a la del hombre, podría darse el caso de que el TS realizado en este estudio se localizara en una **zona anatómica** demasiado “caliente” para evidenciar correctamente los efectos del etamsilato. Sin embargo, esto contrastaría con los resultados obtenidos en conejo, cuya temperatura rectal fisiológica ronda los 39,3°C (Fraser y Mays 1986), por lo que no es plausible que la temperatura corporal justifique los resultados hallados en nuestro estudio.

Tal como se ha comentado anteriormente, la dosis utilizada corresponde a la más elevada de las utilizadas en la clínica, no sólo de vacuno, sino de cualquier especie de destino incluido el hombre y, a dosis mucho más bajas, ha podido demostrarse una reducción importante y duradera del TS tanto en conejo como en el hombre. El hecho de administrar una única dosis de producto tampoco es diferencial respecto a otros estudios realizados en estas especies. Por lo tanto, desde el punto de vista de la bibliografía publicada, no hay motivos para pensar que la dosis utilizada haya sido insuficiente. No obstante, la **extrapolación entre especies** puede ser cuestionable en sí misma dadas las

diferencias fisiológicas observadas en la plaqueta bovina respecto a otras especies y que se han comentado ampliamente en el apartado de revisión bibliográfica.

A este respecto carecemos de unas concentraciones plasmáticas correlacionadas con la eficacia del producto en ninguna especie animal, por lo que no es posible determinar si se alcanzan determinadas concentraciones plasmáticas ni de forma puntual ni a lo largo del tiempo, como sería deseable desde un punto de vista farmacocinético/farmacodinámico. Sin embargo, sobre la base de lo descrito por Toutain (2000), a nivel teórico e ignorando las particularidades de la plaqueta bovina, puede establecerse una equivalencia entre dos especies asumiendo que los niveles plasmáticos efectivos que hipotéticamente debieran alcanzarse, sean los mismos en ambas especies. Para ello bastaría con comparar sus respectivos valores del aclaramiento plasmático, que es un parámetro propio de cada molécula e independiente de la dosis administrada, en relación con la dosis de referencia establecida como eficaz ( $D_{\text{nueva especie}} = D_{\text{especie referencia}} \times Cl_{\text{nueva especie}} / Cl_{\text{especie de referencia}}$ ; Toutain 2000).

Aplicando este criterio a las dosis utilizadas en los estudios de eficacia en el hombre y los valores de Cl comentados en el apartado de farmacocinética, la dosis teórica para bóvidos sería sensiblemente mayor a la utilizada en este estudio. Sin embargo, hay que recordar que, según diversos autores (Esteve y cols. 1959, Laporte y Esteve 1967, Chanal 1969), el efecto máximo del etamsilato no se produce en presencia de altas concentraciones en plasma, sino que el efecto antihemorrágico se observa entre 1 y 3 posteriores a su administración (coincidente con las máximas concentraciones plasmáticas cuando se administra por vía IV). Según los datos farmacocinéticos disponibles, y obviando que las dosis empleadas no fueron exactamente las mismas, en este intervalo de tiempo las concentraciones plasmáticas son de entre 15 y 30 µg/ml en el hombre (Martin 1983) y en nuestro estudio farmacocinético, a las 2 h tras la administración IV, las concentraciones plasmáticas fueron de tan sólo 4 µg/ml. Si bien estas diferencias son substanciales, hay que tener presente lo descrito por Laporte y

Esteve (1967) en cuanto a que dosis tan bajas como 5 mg/kg son suficientes para observar el efecto máximo de reducción del TS en el conejo, si bien su duración sería más limitada que a dosis superiores. Lamentablemente carecemos de datos concretos de los niveles plasmáticos del etamsilato en conejo, y por tanto, no podemos extrapolar directamente las dosis de una especie a la otra. No obstante, según los estudios realizados en conejo y hombre, cuanto menor es la dosis, menor efecto se consigue y, por tanto, la diferencia esperable entre tratamientos es más pequeña y consecuentemente mayor es la dificultad para detectarla, por lo que posiblemente la potencia del estudio (con sólo diez animales) sea insuficiente para detectar el efecto de las concentraciones plasmáticas descritas.

Finalmente, hay que tener en cuenta las **peculiaridades propias de la plaqueta bovina**. Su relativa insensibilidad a muchos de los agonistas que inducen la agregación plaquetar en la mayoría de las especies comúnmente estudiadas (Bondy y Gentry 1989, Soloviev y cols. 1999) podría requerir la presencia de mayores concentraciones de etamsilato para que éste pudiera ejercer plenamente su efecto antihemorrágico. Sin embargo, dada la relación propuesta por diversos autores (Vinazzer 1980, Kovacs y Falkay 1981, Ment y cols. 1984) entre el efecto del etamsilato sobre la adhesión plaquetar y la inhibición de la  $PGI_2$ , es especialmente interesante recordar la práctica insensibilidad de las plaquetas bovinas a los eicosanoides y, por tanto, a sus inhibidores (Gentry y cols. 1989, Bondy y Gentry 1989, Swier y cols. 1989).

Si, en efecto, la acción del etamsilato pasara, necesaria o mayoritariamente, por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas ( $PGF_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGI_2$  y  $TXA_2$  según Kovacs y Falkay 1981) todas las acciones observadas en las especies de laboratorio y en el hombre quedarían en entredicho a efectos de su extrapolación a la especie bovina. Por otra parte, hay que recordar que también se postula un efecto angioprotector que podría traducirse en una disminución del TS por otros mecanismos (polimerización del ácido

hialurónico según Thomas 1962 y Hachen 1965), y no hay motivos para pensar que no pudiera actuar con igual eficiencia en esta especie.

#### **6.4 Propuestas para futuras investigaciones**

Todo lo antedicho sobre las diferencias encontradas en nuestro estudio de eficacia respecto a lo descrito en la literatura científica en otras especies, junto con los diversos considerandos en cuanto a dosis utilizadas, tiempos para la realización del test, concentraciones plasmáticas, extrapolación entre especies y particularidades de la plaqueta bovina, en aparente contradicción con una práctica clínica muy extendida y considerada eficaz, hace que sea necesario seguir profundizando en las investigaciones del uso del etamsilato en la especie bovina.

Dada la carencia de datos preclínicos en la especie bovina, para la demostración de la eficacia del etamsilato debe poderse medir su efecto a diferentes tiempos tras su administración y también a diferentes dosis. Ello permitiría trazar curvas dosis-efecto que serían de gran utilidad para establecer las dosis y pautas óptimas para su utilización práctica. La combinación de estas determinaciones con el conocimiento de las concentraciones plasmáticas presentes a cada momento sería asimismo muy útil para intentar establecer algún tipo de relación farmacocinética-farmacodinámica y trazar también curvas concentración-efecto que permitirían comparar la eficacia de diferentes modos y momentos de administración e incluso comparaciones interespecies. Por otra parte, la demostrada buena tolerancia del etamsilato en bóvidos a altas dosis y por un

tiempo prolongado permite disfrutar de un amplio margen de maniobra en las dosis a utilizar en un eventual estudio de titulación de dosis en esta especie.

A efectos prácticos hay que tener en cuenta que la especie bovina presenta una variabilidad individual mucho mayor a las especies de laboratorio, por lo que es necesario limitar el número de animales a niveles razonables e intentar repetir el test de forma seriada en los mismos animales. La determinación de las concentraciones plasmáticas de etamsilato a cada momento no presenta mayores dificultades técnicas en esta especie, sin embargo es más complicado el realizar repetidamente una demostración de su eficacia tal como se ha planteado en el presente estudio ya que sería necesario medir el efecto del etamsilato de manera repetida a diferentes tiempos y, para ello, el TS presenta diversos inconvenientes que lo hacen inadecuado a este propósito. En primer lugar, se requiere una estricta sujeción del paciente que no puede prolongarse de manera efectiva durante horas sin correr el riesgo de desvirtuar la validez de los resultados. En segundo lugar, la zona anatómica sobre la que se realiza el test no permite la realización repetida de incisiones por ser excesivamente reducida. A este respecto hay que tener en cuenta que la vascularización de la zona donde se realiza el TS es determinante para la obtención de resultados fiables, por lo que no puede extenderse en demasía. Finalmente, la realización del TS aún controlando todos los factores de variación e incluso si se realiza por una misma persona, presenta una gran subjetividad en su determinación que sería deseable poder obviar.

Por tanto, a efectos de medir el efecto de diversas dosis de etamsilato sobre la capacidad hemostática de los bóvidos a lo largo del tiempo sería necesario definir un test “ex vivo” que pudiera realizarse preferiblemente en extracciones seriadas de sangre tras las diversas administraciones y utilizando algún sistema preciso y objetivo de medida.

Dando por válido el acuerdo existente en la literatura, y corroborado parcialmente por nuestro estudio en la especie bovina, respecto al efecto del etamsilato circunscrito a la

hemostasia primaria, el test a utilizar debe poder medir con precisión la actividad plaquetar, la actividad endotelial o bien la interacción endotelio-plaqueta (o subendotelio-plaqueta). Dado que las teorías existentes respecto al mecanismo de acción del etamsilato no han sido suficientemente definidas ni se excluyen otros modos de acción no descritos en la literatura, sería un largo camino buscar efectos en la expresión de determinadas proteínas o receptores involucrados en la activación plaquetar (GPIb, FvW, P-selectina, etc), a pesar de que, en principio, existe tecnología suficiente en este momento para poder cuantificar la presencia de factores muy específicos, principalmente mediante técnicas de ELISA (Roncalés y Sancho 2000). Puesto que nuestro objetivo no consiste en la determinación precisa del mecanismo o mecanismos de acción del etamsilato, sino que sólo se pretende demostrar su eficacia, es necesario utilizar un test que permita una aproximación menos específica y que cubra un rango más amplio de posibilidades.

Los estudios de agregometría ofrecen alguna posibilidad a este respecto, sin embargo, estudios anteriores no han mostrado que el etamsilato ejerza una acción significativa en sangre de otras especies. Al igual que en el caso del tromboelastograma, tampoco está clara la correlación de este tipo de tests con lo observable *in vivo* (Trentalange y Walts 1991, Borzini y cols. 1999). Los tests de retención plaquetar presentan una buena aproximación a la hemostasia primaria y podría ser una posibilidad que ya ha sido explorada en bóvidos con enfermedad de von Willebrand (Sullivan y cols. 1994, Roussi y cols. 1998). También se han desarrollado métodos específicos que permiten, mediante citometría de flujo, detectar anticuerpos frente a plaquetas activadas en sangre bovina que podrían evidenciar el posible efecto del etamsilato sobre la velocidad de la activación plaquetar (Baker y cols. 1998). La disponibilidad del material necesario para la realización de estas técnicas en sangre bovina y su correlación con las situaciones clínicas, son posiblemente las mayores dificultades para su uso en la demostración de la eficacia del etamsilato.

En este sentido, recientemente se ha desarrollado lo que ha venido a llamarse el test del TS *in vitro* o “closure time” que utiliza un analizador de la función plaquetar disponible comercialmente (Platelet Function Analyzer o PFA-100<sup>xx</sup>, que supone una evolución del Thrombostat 400<sup>xxi</sup> basado en el mismo principio; Borzini y cols. 1999). Este test simula *in vitro* el flujo sanguíneo sobre el endotelio alterado con la presencia de agonistas y mide el tiempo necesario para que se ocluya el conducto, el cual muestra una muy buena correlación con el TS en el hombre, con la ventaja de una mayor simplicidad y sensibilidad a posibles alteraciones de la hemostasia primaria (Alshameeri y Mammen 1995, Favalaro 2001, Callan y Giger 2001). Al utilizar sangre citratada puede ser una buena alternativa para su uso en determinaciones reiteradas del TS tras la administración del etamsilato. Por otra parte, si bien el sistema se encuentra ya validado y disponible comercialmente para su uso en humanos, sería necesario ponerlo a punto para poder usarse con fiabilidad en sangre bovina.

A partir de un estudio preciso de diferentes dosis a diferentes tiempos de administración y de sus correspondientes efectos sobre un test repetible y previamente validado en bóvidos, podría establecerse con fiabilidad una dosis y un tiempo de administración óptimos para la demostración experimental, en casos clínicos reales, de una disminución del sangrado durante o tras determinadas intervenciones quirúrgicas o manipulaciones obstétricas en esta especie.

---

<sup>xx</sup> Dade, Miami, FL, EEUU.

<sup>xxi</sup> Golz, Seean, Alemania.

# **Capítulo 7**

# **CONCLUSIONES**



## **7 CONCLUSIONES**

1. El etamsilato, administrado a bóvidos por vía intravenosa, se distribuye de forma limitada a los tejidos corporales, presentando unas concentraciones plasmáticas inicialmente elevadas, que decrecen con gran rapidez, y muestran una semivida biológica de entorno a 1,5 h.
2. El etamsilato, administrado a bóvidos por vía intramuscular, se absorbe rápida y extensamente desde el punto de inoculación, alcanzando concentraciones plasmáticas más bajas pero más persistentes que tras la administración intravenosa. Su biodisponibilidad por esta vía de administración es muy elevada, alcanzando valores medios superiores al 98%.
3. Tras la administración intramuscular de etamsilato a bóvidos no se observan alteraciones clínicamente apreciables en el punto de inoculación ni signo alguno de destrucción tisular, lo que es indicativo de una buena tolerancia al producto.
4. Su elevada biodisponibilidad y su buena tolerancia local hacen de la vía intramuscular una ruta de administración adecuada en la especie bovina.

5. Tras su administración intravenosa a dosis doble durante un período de tratamiento superior al recomendado para la especie bovina, el etamsilato no altera los parámetros clínicos ni sanguíneos que pudieran evidenciar alteraciones a nivel sistémico, lo cual garantiza un amplio margen de seguridad para esta especie en condiciones normales de uso a nivel de campo.
6. La administración de una dosis única de etamsilato en bóvidos es eficaz para reducir el tiempo de sangría, aunque es sensiblemente inferior al efecto obtenido en otras especies. Además, la magnitud de esta reducción mantiene cierta proporcionalidad con el valor del tiempo de sangría basal.
7. La administración de etamsilato a bóvidos no produce alteraciones en el recuento plaquetar ni en los tiempos de coagulación, limitándose su acción a la hemostasia primaria.
8. El etamsilato es un fármaco útil para su uso como antihemorrágico en la clínica de vacuno. Tanto tras su administración IV como IM es muy seguro para esta especie, sin producir ningún tipo de efectos adversos, y mostrando una eficacia moderada en la reducción del tiempo de sangría a la dosis recomendada, lo que puede ser indicativo de una disminución del sangrado excesivo en la práctica quirúrgica.