



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**

**TESIS DOCTORAL**

**EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA COAGULACIÓN  
MEDIANTE TROMBOELASTOGRAFÍA EN LA  
ESPECIE EQUINA**

**José Leandro Méndez Angulo**

**Córdoba, 2011**

TITULO: *Evaluación clínica de la coagulación mediante tromboelastografía en la especie equina*

AUTOR: *José Leandro Méndez Angulo*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 978-84-694-4765-9





**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**

**TESIS DOCTORAL**

**EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA COAGULACIÓN  
MEDIANTE TROMBOELASTOGRAFÍA EN LA  
ESPECIE EQUINA**

Tesis Doctoral que presenta el Licenciado en  
Veterinaria, **José Leandro Méndez Angulo**,  
para optar al Grado de Doctor

Febrero 2011

Vº. Bº.

Los Directores

Prof. Rafael J. Gómez Villamandos

Prof. Indalecio Ruiz Calatrava



RAFAEL J. GÓMEZ VILLAMANDOS e INDALECIO RUIZ CALATRAVA,  
profesores del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad  
de Córdoba

**INFORMAN:**

Que la Tesis titulada “EVALUACION CLINICA DE LA COAGULACION  
MEDIANTE TROMBOELASTOGRAFIA EN LA ESPECIE EQUINA”, de la que  
es autor el Licenciado en Veterinaria D. José Leandro Méndez Angulo, ha sido  
realizada bajo nuestra dirección y asesoramiento en el Departamento de  
Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, y reúne las  
condiciones científicas necesarias para ser presentada ante el tribunal  
correspondiente con el fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente  
informe en Córdoba, a 10 de febrero de 2011.



Fdo. Rafael J. Gómez Villamandos



Fdo. Indalecio Ruiz Calatrava



# INDICE

|   | Página    |
|---|-----------|
| <b>1.- INTRODUCCIÓN</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2.- OBJETIVOS</b>  | <b>7</b>  |
| <b>3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>                                 | <b>13</b> |
| <b>3.1.- FISIOLÓGÍA DE LA HEMOSTASIA</b>                          | <b>13</b> |
| 3.1.1.- <i>Introducción a la hemostasia.</i>                      | <b>13</b> |
| 3.1.2.- <i>Función del endotelio.</i>                             | <b>15</b> |
| 3.1.3.- <i>Las plaquetas.</i>                                     | <b>19</b> |
| 3.1.4.- <i>La coagulación sanguínea.</i>                          | <b>25</b> |
| <b>3.2.- EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA</b>                          | <b>40</b> |
| 3.2.1.- <i>Evaluación de la hemostasia primaria.</i>              | <b>40</b> |
| 3.2.2.- <i>Evaluación de la hemostasia secundaria.</i>            | <b>43</b> |
| 3.2.3.- <i>Evaluación del sistema fibrinolítico.</i>              | <b>46</b> |
| 3.2.4.- <i>Evaluación de la hemostasia global (Técnicas</i>       | <b>48</b> |
| <i>Viscoelásticas).</i>   |           |
| 3.2.4.1.- <i>Desarrollo de la técnica de tromboelastografía</i>   | <b>50</b> |
| <i>en humana.</i>   |           |
| 3.2.4.2.- <i>Desarrollo de la técnica de tromboelastografía</i>   | <b>52</b> |
| <i>en veterinaria.</i>  |           |
| 3.2.4.3.- <i>Desarrollo de la técnica de tromboelastografía</i>   | <b>52</b> |
| <i>en la especie equina.</i>                                      |           |
| 3.2.5.- <i>Evaluación de deficiencias de factores específicos</i> |           |
| <i>de la coagulación.</i>   | <b>54</b> |
| <b>3.3.- EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA EN CABALLOS CON</b>          |           |
| <b>PATOLOGÍAS GASTROINTESTINALES</b>                              | <b>56</b> |
| <b>3.4.- EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA EN POTROS NEONATOS</b>       |           |
| <b>SANOS Y ENFERMOS</b>   | <b>61</b> |



|  |            |
|--|------------|
| <b>4.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | <b>65</b>  |
| <b>4.1.- ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS</b>         | <b>69</b>  |
| 4.1.1.- <i>Caballos adultos sanos.</i>                                   | <b>69</b>  |
| 4.1.2.- <i>Caballos adultos con colitis y sospecha de coagulopatías.</i> | <b>69</b>  |
| 4.1.3.- <i>Potros neonatos sanos.</i>                                    | <b>70</b>  |
| 4.1.4.- <i>Potros neonatos enfermos.</i>                                 | <b>70</b>  |
| <b>4.2.- PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS</b>             | <b>76</b>  |
| <b>4.3.- ANALISIS TROMBOELASTOGRÁFICO</b>                                | <b>78</b>  |
| 4.3.1.- <i>Caballos adultos.</i>   | <b>80</b>  |
| 4.3.2.- <i>Potros neonatos.</i>  | <b>80</b>  |
| <b>4.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>  | <b>82</b>  |
| 4.4.1.- <i>Caballos adultos.</i>   | <b>82</b>  |
| 4.4.2.- <i>Potros neonatos.</i>  | <b>83</b>  |
| <br>   |            |
| <b>5.- RESULTADOS</b>  | <b>85</b>  |
| <b>5.1.- CABALLOS ADULTOS SANOS</b>                                      | <b>87</b>  |
| <b>5.2.- CABALLOS ADULTOS CON COLITIS Y SOSPECHA DE COAGULOPATÍAS</b>    | <b>89</b>  |
| <b>5.3.- POTROS NEONATOS SANOS, ENFERMOS NO SÉPTICOS Y SÉPTICOS</b>      | <b>92</b>  |
| <br>   |            |
| <b>6a.- DISCUSIÓN</b>  | <b>103</b> |
| 6a.1.- CABALLOS ADULTOS SANOS  | <b>103</b> |
| 6a.2.- CABALLOS CON COLITIS Y COAGULOPATÍAS SOSPECHADAS                  | <b>104</b> |
| 6a.3.- POTROS NEONATOS SANOS   | <b>106</b> |
| 6a.4.- POTROS NEONATOS ENFERMOS Y SÉPTICOS                               | <b>107</b> |
| <br>   |            |
| <b>6b.- DISCUSSION</b>   | <b>112</b> |
| 6b.1.- HEALTHY ADULT HORSES  | <b>112</b> |
| 6b.2.- HORSES WITH COLITIS AND SUSPECTED COAGULOPATHIES                  | <b>112</b> |
| 6b.3.- HEALTHY NEONATAL FOALS  | <b>114</b> |
| 6b.4.- SEPTIC AND NON-SEPTIC NEONATAL FOALS                              | <b>115</b> |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>7a.- CONCLUSIONES</b>   | <b>117</b> |
| <b>7b.- CONCLUSIONS</b>    | <b>121</b> |
| <b>8a.- RESUMEN</b>        | <b>123</b> |
| <b>8b.- SUMMARY</b>        | <b>127</b> |
| <b>9.- AGRADECIMIENTOS</b> | <b>129</b> |
| <b>10.- BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>131</b> |

# GLOSARIO

- APL:** antiplasmina
- AT:** antitrombina III
- CID:** coagulación intravascular diseminada
- FIB:** concentración de fibrinógeno
- FSF:** factor estabilizador de la fibrina
- FvW:** factor de von Willebrand
- GP:** glicoproteína de membrana
- MA:** máxima amplitud
- NO:** Óxido nítrico
- PAI-1:** inhibidor del activador del plasminógeno
- PDF:** productos de degradación del fibrinógeno
- PLMG :** plasminógeno
- PLS :** plasmina
- PLT:** recuento plaquetario
- TAFI:** inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina
- TAT:** trombina-antitrombina
- TEG :** tromboelastografía
- TP:** tiempo de protrombina
- TT:** tiempo de trombina
- TTPa:** tiempo de tromboplastina parcial activada
- t-PA:** el activador del PLMG tipo tisular
- u-PA:** el activador del PLMG tipo urocinasa

# INTRODUCCIÓN



## 1.- INTRODUCCIÓN

El término “**coagulación**” se deriva del latín “*coagulare*”, que quiere decir cuajar o en otras palabras, pasar del estado líquido al sólido. Este término se utiliza para referirnos a multitud de procesos donde un líquido pasa al estado sólido. Uno de estos procesos y de vital importancia en ciencias biológicas, es la coagulación de la sangre, la cual tiene un papel principal en la hemostasia sanguínea (complejo proceso por el cual se detiene el sangrado).

La hemostasia sanguínea actúa en el organismo como sistema de seguridad para detener la hemorragia o pérdida de sangre producida por la rotura de la pared de un vaso sanguíneo. Este complejo sistema incluye tres pilares básicos: 1) todos los vasos sanguíneos del organismo (que reaccionaran mediante una vasoconstricción para evitar mayor pérdida sanguínea); 2) las plaquetas (que formaran el tapón plaquetario); y 3) la coagulación propiamente dicha, que incluye la coagulación primaria (activación de las plaquetas) y la coagulación secundaria (cascada de la coagulación).

Por otro lado, una vez que se ha producido el coágulo y se ha restaurado el daño vascular, debe existir un mecanismo que destruya el coágulo sanguíneo ya inservible; este proceso se denomina fibrinolisis. La falta del equilibrio adecuado entre ambos procesos, puede dar lugar a una hemorragia cuando falla la hemostasia, o una trombosis cuando lo que se ve alterado es el proceso fibrinolítico.

Entender cómo ocurre la hemostasia es la base para una completa comprensión de los principales estados patológicos asociados a la hemorragia y/o trombosis. La lesión de un vaso sanguíneo desencadena la siguiente secuencia de procesos:

- El vaso se contrae para reducir el flujo sanguíneo (vasoconstricción).

- Las plaquetas circulantes se adhieren a la pared del vaso en el lugar del traumatismo (tapón plaquetario).

- La activación y agregación de las plaquetas, junto con una compleja serie de reacciones enzimáticas en las que intervienen proteínas de la coagulación, producen fibrina, y forman un tapón hemostático estable.

Este proceso, refinadamente sincronizado, sirve para mantener la integridad del sistema circulatorio. No obstante el proceso se puede desequilibrar, dando lugar a una significativa morbilidad y mortalidad.

En los équidos, las alteraciones de la coagulación están comúnmente asociadas a estados de sepsis y trastornos gastrointestinales (Dallap Schaefer and Epstein, 2009; Feige et al., 2003; Welch et al., 1992). Actualmente, para el estudio de las alteraciones hemostáticas en el caballo, se utilizan varias técnicas de laboratorio. La hemostasia primaria se evalúa mediante el recuento plaquetario (PLT) y el tiempo de sangrado de las mucosas, (Segura and Monreal, 2008) mientras que la hemostasia secundaria o factores de la coagulación son evaluados generalmente mediante los tiempos de protrombina (TP) y tromboplastina parcial activada (TTPa).

Estas pruebas, evalúan las vías extrínseca (TP) e intrínseca (TTPa) de la cascada de la coagulación, incluyendo los factores: I, II, V, VII, X y I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, respectivamente. Para la evaluación completa e interpretación de estas pruebas, siempre se requiere la comparación de los resultados con un animal sano (control). Otros métodos de ayuda al diagnóstico de patologías de la coagulación en caballos, que se están desarrollando en la actualidad, son los siguientes:

- Productos de degradación del fibrinógeno (PDF) (Stokol et al., 2005)
- Dímeros-D (Stokol et al., 2005)
- Antitrombina III (AT) (Bernard et al., 1987)
- Plasminógeno (Prasse et al., 1990; Welles et al., 1990)
- Proteína C (Welles et al., 1990)
- $\alpha_2$ -antitripsina (Prasse et al., 1990)
- Factor de von Willebrand (Brooks et al., 1991)

Las pruebas convencionales utilizadas a día de hoy en la clínica equina, para la evaluación de la hemostasia en caballos son las siguientes:

- Contaje plaquetario (PLT)
- Tiempo de protrombina (TP)
- Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)
- Concentración de fibrinógeno (FIB)

En estas pruebas se fundamentan, tanto el diagnóstico como el tratamiento y monitorización de los pacientes equinos con trastornos coagulativos. Para el establecimiento de un diagnóstico fiable de coagulopatía, normalmente se necesitan varias de estas pruebas, ya que cada una de ellas evalúa una parte aislada del proceso complejo de la hemostasia (Kol y Borjesson, 2010).

La tromboelastografía (TEG), por el contrario, es una técnica novedosa en medicina veterinaria que nos aporta información de todo el sistema hemostático, desde el comienzo de la coagulación, seguido con la formación del coágulo y terminando con el proceso fibrinolítico.

Así, los parámetros tromboelastográficos rutinariamente analizados e interpretados son:

- El "Tiempo R", que representa el tiempo desde la adición del agonista (CaCl<sub>2</sub>) hasta el comienzo de la formación del coágulo. Este parámetro evalúa la actividad de los factores de la coagulación en el plasma.
- El "Tiempo K", que representa la cinética del coágulo, midiendo el tiempo necesario para que la elasticidad del coágulo avance desde 2 hasta 20 mm. Este parámetro evalúa la función y concentración de plaquetas y de fibrinógeno, además de la actividad de los factores de la coagulación en plasma.
- El ángulo "α", que está relacionado con la concentración de fibrinógeno y la rapidez de formación de la fibrina.
- La máxima amplitud "MA", muestra la fuerza de la fibrina y la contribución de la agregación plaquetaria a la formación del coágulo.



También y aunque en menor grado representa la concentración del fibrinógeno.

- El valor G, representa las propiedades viscoelasticidad del coágulo, y se calcula a partir de la máxima amplitud.
- Finalmente, el valor LY60 que representa el porcentaje de lisis del coágulo o reducción de máxima amplitud a los 60 minutos del análisis de la muestra.

Esta novedosa técnica de tromboelastografía (TEG) en la especie equina, se encuentra ampliamente desarrollada en la especie humana y también en los últimos años se han realizado múltiples estudios en pequeños animales (Kraft, 1973; Moalic et al., 1989; Burghardt et al., 1995; de Laforcade et al., 2003; Vilar et al., 2008). Hoy en día, varios hospitales veterinarios universitarios, ya disponen de un tromboelastógrafo para su uso en pacientes clínicos.

Hasta la fecha, en caballos sanos solamente se han realizado estudios en pequeños grupos de animales adultos (Paltrinieri et al., 2008; Epstein et al., 2009; Leclere et al., 2009); y los datos existentes en casos clínicos, se reducen a un estudio para detectar hipercoagulación en caballos con trastornos gastrointestinales (Dunkel et al., 2010), y un caso clínico donde la TEG fue utilizada experimentalmente (Macieira et al., 2007).

Con todos estos antecedentes, en nuestro estudio planteamos los objetivos que se explican con detalle en el siguiente apartado.

# OBJETIVOS

## Objetivos

---

## 2.- OBJETIVOS

El objetivo fundamental de estudio para la elaboración de la Tesis Doctoral, está orientado a demostrar la utilidad de la tromboelastografía como técnica evaluadora del proceso global de la hemostasis en la especie equina, ya que nos permite evaluar todos los estados de la hemostasis, empezando por el inicio de la coagulación, seguido por la formación del coágulo y finalizando con la fibrinólisis.

Además, para el desarrollo de este proyecto, desglosamos nuestra idea en varios objetivos específicos que consideramos de vital importancia para que sirva de utilidad práctica en la clínica médica de los équidos:

1º.- Analizar la hemostasia mediante tromboelastografía en equinos clínicamente sanos, tanto adultos como potros neonatos menores de 8 días de edad, para determinar y establecer valores de referencia para los parámetros de la TEG (Tiempo-R, Tiempo-K, ángulo  $\alpha$ , máxima amplitud MA, valor G y LY60).

2º.- Evaluar la hemostasia mediante tromboelastografía y las técnicas tradicionales de evaluación de la coagulación (PLT, TTPa, TP, y FIB) en caballos con patologías gastrointestinales de tipo inflamatorio (colitis).

3º.- Analizar los trastornos hemostáticos en potros neonatos enfermos con septicemia y por otras causas (Ej. impactación por meconio, deformidades flexurales y/o angulares) mediante tromboelastografía y con las técnicas tradicionales de evaluación de la coagulación (PLT, TTPa, TP, FIB, y AT).

4º.- Comparar los resultados de la tromboelastografía con las técnicas tradicionales para el diagnóstico de patologías hemostáticas en los équidos.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## **3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1.- FISIOLOGÍA DE LA HEMOSTASIA**

#### **3.1.1. – *Introducción a la hemostasia***

Los animales en su evolución han desarrollado un complejo sistema hemostático diseñado para mantener la sangre en estado líquido bajo condiciones fisiológicas, pero a su vez preparado para reaccionar ante una lesión vascular repentina, con el propósito de detener la pérdida de sangre, sellando el defecto en la pared del vaso.

El endotelio vascular mantiene la fluidez de la sangre mediante inhibición de la coagulación sanguínea, la agregación plaquetaria y la fibrinólisis. También, proporciona una barrera protectora que separa las células sanguíneas y los factores del plasma de elementos altamente reactivos en las capas más profundas de la pared vascular. Estos componentes incluyen proteínas de adhesión tales como el colágeno, la fibronectina, laminina, vitronectina, y el factor de von Willebrand (FvW), que promueven la adhesión de plaquetas y factor tisular, una proteína de membrana situada en el músculo liso, fibroblastos y macrófagos, que provoca la coagulación de la sangre.

Cuando un vaso sanguíneo se lesiona, se contrae, desviando así la sangre del lugar de la lesión, y la sangre derramada se expone a estas estructuras subendoteliales que estimulan la formación de un tapón hemostático, promoviendo la adhesión y agregación plaquetaria y la activación de la coagulación sanguínea. Posteriormente, las plaquetas son estimuladas por el colágeno subendotelial, que expone y agrega a las glicoproteínas de



membrana (GP) IIb y GP IIIa, que puede actuar uniendo a los cofactores como el fibrinógeno y FvW a las plaquetas, originando la agregación. La secreción de proteínas está mediada por la síntesis de tromboxano, la fosforilación de proteínas específicas, y la translocación de calcio intracelular.

Los cofactores proteicos como el factor V, segregados por las plaquetas o los derivados del plasma, sirven como lugar para ensamblar un complejo cofactor enzimático en la superficie plaquetaria, con lo que se activa el factor X y la protrombina. El resultado es la formación de trombina, que aumenta su propia producción muchas veces mediante la conversión de los factores V y VIII en cofactores activados y ello estimula la secreción de las plaquetas.

Esta reacción explosiva, celular y molecular, es modulada por las células endoteliales que elaboran lípidos antitrombóticos (prostaciclina o PGI<sub>2</sub>), proteínas (trombomodulina), compuestos inorgánicos [óxido nítrico (NO)], y los polisacáridos (heparán); por enzimas de unión a la superficie, como la adenosina difosfatasa (ADPasa) (CD39), y por varios inhibidores de las proteasas plasmáticas, siendo la más importante la antitrombina (AT) III para los factores IXa, Xa, y la trombina, inhibidor de C1, para las enzimas de contacto del factor XIIIa.

El principal sustrato de la trombina es el fibrinógeno, que después de la hidrólisis inicial, forma monómeros de fibrina que se polimerizan espontáneamente para formar el coágulo de fibrina. La red aumenta su firmeza por la trombina que activa la enzima del factor XIIIa aumentando así la resistencia del coágulo a la fibrinólisis. La red covalente unida por la trombina, activa la enzima del factor XIIIa aumentando así la resistencia del coágulo a la fibrinólisis.

El plasminógeno, un zimógeno del plasma, se convierte en plasmina por dos activadores del plasminógeno que son elaborados por las células endoteliales. El proceso está modulado al menos por tres inhibidores del activador del plasminógeno. La plasmina, por lo general, no actúa sobre el fibrinógeno en solución debido a la presencia de plasmina en la superficie del

coágulo de fibrina, el cual está protegido contra el inhibidor, y la fibrinólisis se produce con la formación de productos de degradación de la fibrina. En segundo lugar, el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) producido por las células endoteliales y las plaquetas, neutraliza al activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y previene la lisis temprana del coágulo. En tercer lugar, la trombina activa a una proenzima carboxipeptidasa B, llamado inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI), que afecta a la degradación fibrinolítica de filamentos de fibrina. Actualmente se está investigando sobre la importancia y función de esta proenzima en la hemostasia; se ha demostrado que un exceso en TAFI plasmático induce un estado pro-coagulable, y por el contrario se ha sugerido que una disminución en TAFI plasmático resulta en un estado propenso al sangrado. Por tanto, cada vez toma más fuerza la teoría de que el TAFI es un elemento importante en el mantenimiento del equilibrio hemostático.

Por lo tanto, con la coagulación más activa y con la conversión más completa de la protrombina en trombina, no sólo hay más cantidad de fibrina formada a partir de fibrinógeno, si no que ésta, está protegida de la fibrinólisis por TAFI. La disolución del coágulo facilita la deposición de colágeno, la formación de tejido fibroso, y la cicatrización de heridas.

### **3.1.2.- Función del endotelio.**

El endotelio mantiene la fluidez de la sangre mediante la producción de inhibidores de la coagulación sanguínea y de la agregación plaquetaria. Además, es el encargado de la modulación del tono vascular y la permeabilidad, y de proporcionar una envoltura protectora que separa los componentes hemostáticos de la sangre de reactivos situados en las estructuras subendoteliales. Las células endoteliales sintetizan y secretan componentes en la membrana basal y la matriz extracelular, que contienen proteínas de adhesión como el colágeno, la fibronectina, laminina, vitronectina, y FvW.

El endotelio inhibe la coagulación de la sangre mediante la síntesis y secreción de trombomodulina y el sulfato de heparán en la superficie; modula la fibrinólisis ya que sintetiza y secreta t-PA, activador del plasminógeno uroquinasa (u-PA) y el activador o inhibidores del plasminógeno, inhibe la agregación plaquetaria por la liberación de PGI<sub>2</sub> y NO (óxido nítrico), y regula el tono de la pared del vaso por la síntesis de endotelinas, que inducen la vasoconstricción, y PGI<sub>2</sub> y NO, que producen vasodilatación.

Una función vascular defectuosa puede causar sangrado patológico si el endotelio se vuelve más permeable a las células de la sangre, si la respuesta vasoconstrictora se deteriora debido a anomalías estructurales de la pared del vaso o de los tejidos extravasculares, o si la fibrinólisis fisiológica no está controlada por la producción normal de inhibidor del activador del plasminógeno.

El sangrado asociado con la lesión endotelial puede estar mediado por complejos inmunes y virus (MacGregor et al., 1980; Cines et al., 1987). Las enzimas proteolíticas liberadas por los leucocitos en los estados inflamatorios perturban las células endoteliales y alteran las proteínas del tejido conjuntivo, y también pueden contribuir a la hemorragia petequiral en trastornos vasculíticos (Janoff et al., 1977; LeRoy et al., 1984). La atenuación y fenestración del endotelio vascular puede contribuir a las manifestaciones hemorrágicas de la púrpura trombocitopénica idiopática, que puede responder al tratamiento con esteroides en una terapia rápida, o incluso antes del aumento perceptible del número de plaquetas (Kitchens, 1982).

Las células endoteliales pierden sus propiedades de protección antitrombogénica después de que son estimuladas por enzimas como la trombina, o por hipoxia, estrés, oxidantes; citocinas como la interleucina-1, factor de necrosis tumoral, gamma interferón; hormonas sintéticas tales como acetato de desmopresina y endotoxinas. La síntesis de factor tisular y PAI-1 es inducida y la concentración de trombomodulina unida a su superficie es reducida por citoquinas y endotoxinas. Las células endoteliales también contienen receptores, llamadas integrinas, que permiten la unión de la

fibronectina, colágeno y laminina (Hynes, 1987). Una vez que la célula endotelial ha sido estimulada, ésta sintetiza quimioquinas, como la proteína quimiotáctica de monocitos y la interleuquina-8.

Las células endoteliales también contienen moléculas de adhesión intercelular, que actúan como receptores opuestos a las integrinas de los leucocitos. Antes de su adherencia al endotelio, el papel de las plaquetas y leucocitos, consiste en una interacción mediada por la selectina E y selectina P.

El endotelio vascular es heterogéneo, tanto metabólicamente como estructuralmente. Por ejemplo, la enzima convertidora de angiotensina, parece ser sintetizada por la mayoría de las células endoteliales, pero principalmente es sintetizada por el endotelio de la aorta, y no por los microvasos del endotelio cardiaco. Sin embargo, por su parte, el tromboxano no es sintetizado por la mayoría de células endoteliales, pero si es sintetizado por el endotelio arterial pulmonar. La renovación de las células endoteliales es baja en condiciones de reposo, pero varía con su localización. Por tanto, en los sitios de estrés hemodinámico y daño endotelial, la proliferación es especialmente mayor.

La permeabilidad de los vasos puede verse comprometida bajo determinadas circunstancias, incrementándose por vasodilatación, por inducción de una severa trombocitopenia, y por la administración de altas dosis de heparina; explicándose así el sangrado espontáneo que se observa con un recuento bajo de plaquetas o después de la infusión de heparina. La trombocitopenia induce por tanto la extravasación de eritrocitos, que se manifiesta clínicamente como petequias.

La pérdida de la función de la barrera endotelial, asociada con una disminución extrema de plaquetas, puede estar relacionada con una pérdida de serotonina y norepinefrina liberadas por las plaquetas al medio microvascular; bien, como fuentes exógenas de otras aminas que previenen la formación de petequias en animales severamente trombocitopénicos, o por el fallo de las plaquetas para tapar huecos de las uniones intracelulares entre las células endoteliales retraídas.

Las células endoteliales están cargadas negativamente, siendo esta una característica que puede repeler a las plaquetas cargadas negativamente. Esta superficie aniónica, así como otras propiedades antitrombóticas del endotelio, puede ser un factor importante para limitar la extensión intravascular de la reacción hemostática inducida por la lesión vascular (Ofosu et al., 1989). Por lo tanto, el sintetizado y liberado de las células endoteliales cerca del sitio de la formación de tapón hemostático, podría inhibir la agregación plaquetaria intravascular (Weksler et al., 1977; Marcus et al., 1978; Moncada y Vane, 1979; Weiss y Turitto, 1979).

La trombomodulina se une a la trombina e inhibe la capacidad de la enzima que forma el fibrinógeno y activa a las plaquetas y a los factores Va y VIIIa. La trombomodulina también mejora la capacidad de la trombina para activar la proteína C. La proteína C se une al receptor de la proteína C de las células endoteliales, lo que aumenta su activación (Fukudome y Esmon, 1994). La proteína C, a su vez, inactiva los factores Va y VIIIa y aumenta la fibrinólisis, probablemente uniendo a los inhibidores de los activadores del plasminógeno (Esmon et al., 1982). La trombina unida a la trombomodulina también es inactivada por AT circulante.

Por lo tanto, las células endoteliales expuestas a los estímulos adecuados sintetizan y liberan distintos mediadores de vasodilatación e inhiben la función de las plaquetas (Warner et al., 1989). Dicha estimulación hace que estas células también sinteticen un grupo de péptidos conocidos como endotelinas que tienen propiedades reguladoras, incluyendo la vasoconstricción (MacCumber et al., 1989). Las células endoteliales también producen activadores del plasminógeno que, en presencia de fibrina, pueden promover la fibrinólisis agravando la tendencia a la hemorragia en pacientes susceptibles. Esta tendencia a la hemorragia puede ser controlada por los inhibidores fibrinolíticos naturales y/o sintéticos.

El PAI-1 (cuyas siglas corresponden a “plasminogen activator inhibitor-1”, o lo que es lo mismo “inhibidor del activador del plasminógeno”) también es elaborado en respuesta a diferentes estímulos (Wiiman et al., 1984). La deficiencia de PAI-1 causa una tendencia al sangrado, ya que si no hay una oposición fisiológica a la fibrinólisis, y el equilibrio hemostático se ve alterado. Las células endoteliales son estimuladas por citoquinas y otros mediadores para instaurar una respuesta procoagulante caracterizada por un aumento de la síntesis y liberación de PAI-1, liberación de FvW, la síntesis y la disponibilidad de factor tisular, y la reducción de la trombosmodulina asociada a la membrana celular.

La compleja interacción entre los mediadores de la pared de los vasos, el revestimiento endotelial, e incluso la regulación del tono vasomotor de las arterias y venas, afecta a la cicatrización de heridas y a la hemostasia. Todos estos procesos vasculares actúan en concierto con los complejos procesos que similarmente tienen lugar en las plaquetas, en la coagulación de plasma, y en vías fibrinolíticas y en sus inhibidores para mantener la hemostasia normal. Sin embargo, en ocasiones, la respuesta hemostática es excesiva y lleva a la trombosis intravascular.

### **3.1.3. Las plaquetas.**

Las plaquetas son producidas a partir de los megacariocitos de la médula ósea, una célula gigante con múltiples núcleos (de 8 a 32) producto de una división nuclear sin división celular (George, 2000). Datos recientes muestran que la fragmentación es similar a la apoptosis, ya que es el resultado de la activación de la caspasa dentro del megacariocito (De Botton et al., 2002). El factor de crecimiento dominante es la trombopoyetina, que es responsable de la replicación del ADN y de la diferenciación citoplasmática (Kaushansky, 1998).

La participación de las plaquetas en la hemostasia primaria es parte fundamental del proceso fisiológico, e incluye las siguientes reacciones: adhesión a la base del daño del vaso sanguíneo, difusión de las plaquetas

adheridas en la superficie subendotelial, secreción de los componentes de las plaquetas almacenadas (incluyendo las moléculas implicadas en la hemostasia y la cicatrización de heridas), y la formación de grandes agregados plaquetarios (Ruggeri et al., 1999). Además, hay zonas de la membrana de las plaquetas específicas para la adherencia y concentración de factores de coagulación, acelerando así la coagulación del plasma, y resultando en la rápida formación de una red de fibrina que refuerza el tapón de plaquetas. Una vez que la formación del coágulo se ha completado y éste, ha realizado su función taponadora, se inicia la retracción del mismo, en un proceso que también depende de las plaquetas.

En condiciones fisiológicas, las plaquetas no se adhieren a las células endoteliales, al menos que exista un área de alteración endotelial (por ejemplo, el extremo del corte de un vaso sanguíneo dividido) donde se encuentran receptores específicos para las proteínas de adhesión (FvW a través de la GP Ib / IX / V, y el fibrinógeno y la fibronectina a través de los receptores de la integrina) (Pytela et al., 1986).

Una vez que las plaquetas se han adherido al subendotelio, distribuyéndose por la superficie, otras plaquetas adicionales son emitidas por la sangre circulante, las cuales se adhieren primero a la capa basal de las plaquetas ya adheridas y finalmente unas a otras, formando el agregado plaquetario. Un acontecimiento crucial en este proceso es la inducción de un cambio en la disposición de la superficie de la membrana glicoproteína (GP) IIb / IIIa [ahora conocida como integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , (Shattil et al., 1998)], que adquiere la capacidad de unirse al fibrinógeno, así como al FvW, a la fibronectina y la vitronectina (Shattil et al., 1985). El fibrinógeno parece ser el más importante en la agregación, en virtud de su estructura divalente, permitiendo así formar un puente de plaqueta a plaqueta y por lo tanto potenciando la agregación (Figura 1).

Otras integrinas de la membrana de las plaquetas actúan como receptores de proteínas adhesivas del plasma. Estos heterodímeros, tales como el receptor de la vitronectina, están presentes en la superficie de las

células de la sangre y de las células endoteliales (Lam et al., 1989). De esta forma, el FvW y el colágeno pueden interactuar con plaquetas en reposo, mientras que el fibrinógeno solamente se une con la integrina GP IIb / IIIa de las plaquetas activadas (Bennett y Vilaire, 1979).

La interacción con los receptores (GP) de la membrana de las plaquetas, también es una característica de la participación en la agregación plaquetaria por parte de la fibronectina y la trombospondina. La interacción de esta última con la GP IV puede actuar estabilizando los agregados plaquetarios.

Algunos de los agonistas de las plaquetas, tienen capacidad para inducir agregación y secreción; siendo los de mayor relevancia fisiológica la trombina, ADP, colágeno, ácido araquidónico y epinefrina (Figura 1). La epinefrina es la única de éstos que no da lugar a un cambio detectable en la forma de las plaquetas. Existen receptores específicos en la superficie de la plaqueta para estos agonistas (Colman, 1990). Algunos de estos receptores interactúan con proteínas diana, situadas junto a los canales de iones permeables en las membranas plaquetarias, modulando el flujo de iones, sobre todo el movimiento hacia adentro de calcio ionizado. Otros están vinculados con la proteína tirosina quinasa (TK) que fosforilan otros sitios en la proteína del mismo receptor.

Muchos de los procesos implicados en la activación plaquetaria son calcio dependientes, incluyendo la fosforilación de la cadena ligera de la miosina por una enzima quinasa específica y la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana por la enzima fosfolipasa A2 (Adelstein y Conti, 1975; Pickett et al., 1976). La fosfolipasa libera ácido araquidónico de la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos. El ácido araquidónico es convertido, por la enzima ciclooxigenasa, en endoperóxidos de prostaglandina, y en última instancia, en potente agonista plaquetario del tromboxano, así como a las prostaglandinas estables como la prostaglandina. Esta última, inhibe la activación plaquetaria y, en un sistema de retroalimentación negativo, puede servir para modular la actividad plaquetaria. Una serina reactiva de la



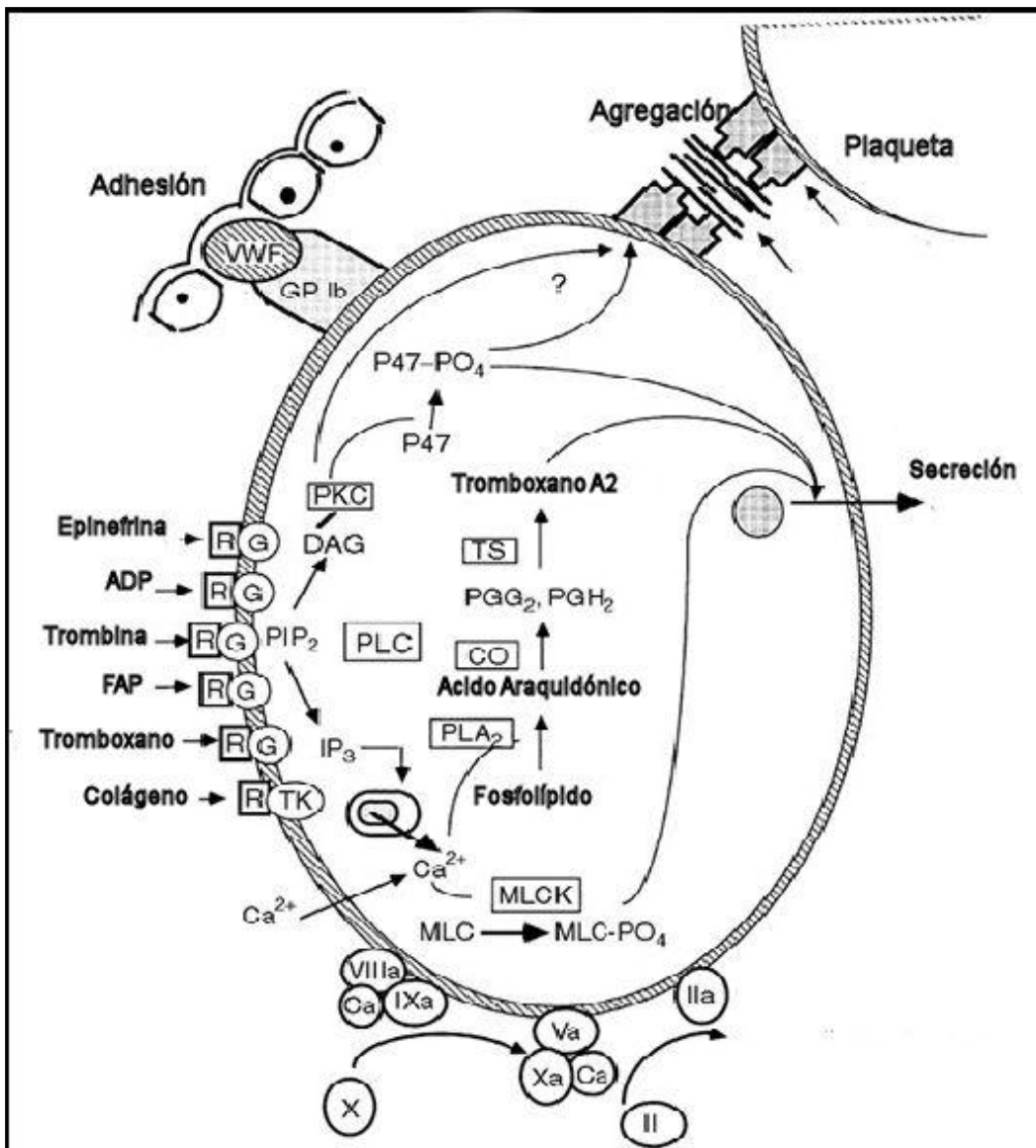
ciclooxigenasa es transformada por la aspirina, inactivando la enzima de forma permanente.

Las plaquetas contienen varias clases de gránulos en los cuales hay componentes intracelulares; entre ellos están los "cuerpos densos" (que contienen serotonina, ATP, ADP, pirofosfato, y calcio), los gránulos- $\alpha$  (que contienen fibrinógeno, FvW, fibronectina, antitripsina- $\alpha$ 1, tromboglubulina- $\beta$ , factor plaquetario-4, y factor de crecimiento derivado de las plaquetas), y los lisosomas (que contienen una variedad de hidrolasas ácidas). En humanos y pequeños animales, la liberación de gránulos por parte la plaqueta, está condicionada por la presencia de una elevación del calcio citoplasmático, la cual, induce una fusión del envoltorio granular con la superficie de membrana de los canalículos intracelulares y hay una secreción externa del contenido de los gránulos. Sin embargo, en rumiantes y équidos, la liberación de los gránulos se produce directamente mediante una fusión de estos con la membrana externa, vertiéndose su contenido al exterior (Boudreaux, 2018).

La activación plaquetaria y sus efectos son modulados por otras sustancias reguladoras, de las que el más importante es el AMPc (Haslam, 1978). Al igual que prácticamente todas las células animales, excepto las células rojas, las plaquetas contienen la adenilato ciclase, la enzima que convierte el ATP a AMPc. Su acción está fuertemente estimulada por los productos del ácido araquidónico, prostaglandinas en las plaquetas y (prostaciclina) en las células endoteliales. Las plaquetas también contienen fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos AMPc que se unirá al AMP, modulando la concentración intracelular de AMPc (Colman, 1999). El AMPc, estimula una proteína quinasa que interviene en la fosforilación de un ATP dependiente del sistema de bombeo del calcio que extrae el calcio del citosol. En concentración suficiente, el AMPc no solo inhibe la agregación, secreción y el cambio de forma de las plaquetas, sino también la adhesión a las superficies.

**Figura 1.** – Representación de la función plaquetaria. La adhesión a las células endoteliales está mediada por las glicoproteínas (GP) Ib, que se unen al factor de von Willebrand (FvW) en el endotelio celular. La agregación también esta

mediada por la GP IIb / IIIa de dos plaquetas, donde el fibrinógeno actúa de puente entre ellas. Varios agonistas como el difosfato de adenosina (ADP) y el factor activador de plaquetas (FAP) están representados interactuando con receptores específicos y activando la fosfolipasa C. Esta enzima cataliza la escisión del fosfatidil inositol bifosfato ( $PIP_2$ ) a  $IP_3$ , que moviliza el  $Ca^{2+}$  desde el sistema tubular denso, para activar las cadenas ligeras de la miosina quinasa, lo cual fosforila la cadena ligera de la miosina (MLC). El  $Ca_2$  también activa la fosfolipasa  $A_2$  para liberar ácido araquidónico de los fosfolípidos, que a su vez son convertidos por la ciclooxigenasa a  $PGG_2$  y  $PGH_2$  y, a continuación, por la tromboxano sintetasa (TS) a tromboxano  $A_2$ . El otro producto de la división del  $PIP_2$  es el diacilglicerol (DAG), que estimula la proteína quinasa C a fosforilato, la proteína intracelular P47 a P47- $PO_4$ . Este último, el tromboxano y el MLC- $PO_4$ , juntos estimulan la secreción de los "cuerpos densos", gránulos- $\alpha$  y los gránulos lisosomales. La actividad plaquetaria coagulante es generada por los factores de la coagulación, que se muestra en forma de números romanos (VIII, IXa,  $Ca_2$ ) y el "complejo protrombinasa" (Va-Xa- $Ca_2+$ ), sobre los fosfolípidos de la membrana externa de plaquetas para convertir la protrombina (II) en trombina (IIa) (Colman et al., 2006).



Además de los anteriormente mencionados, existen otros controles sobre la activación plaquetaria situados en la superficie de las células endoteliales, el ADP-destroyente, la ectoenzima (ADPasa), y la trombomodulina, un potente inhibidor de la trombina. Las células endoteliales, cuando son estimuladas por agonistas como el ATP, producen óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador que inhibe la función plaquetaria mediante el aumento de GMPc plaquetario. Hay pruebas que indican que las plaquetas tienen también la condición para formar NO a partir de L-arginina y que esto se traduce en un aumento en la concentración de GMPc, que es un potente

regulador intracelular de la actividad de las plaquetas (Rapoport y Murad, 1983).

### 3.1.4- La coagulación sanguínea

La coagulación de la sangre comprende una serie de reacciones donde intervienen los componentes celulares, así como los factores de la coagulación sanguínea (Tabla 1). La mayor parte de estos factores se encuentran en el plasma en forma de proenzimas y se nombran con números romanos seguidos del sufijo “a” para indicar que están activados. Se sintetizan en el hígado, donde la vitamina K es necesaria para la producción de los factores II, VII, IX y X.

**Tabla 1.-** Factores de la coagulación sanguínea.

| Factores de la coagulación sanguínea |   |
|--------------------------------------|---|
| I                                    | Fibrinógeno                                 |
| II                                   | Protrombina                                 |
| III                                  | Tromboplastina. Factor tisular              |
| IV                                   | Calcio                                      |
| V                                    | Proacelerina                                |
| VI                                   | Acelerina (FVa)                             |
| VII                                  | Proconvertina                               |
| VIII                                 | Factor antihemofílico A                     |
| IX                                   | Factor Christmas o antihemofílico B         |
| X                                    | Factor Stuart-Power                         |
| XI                                   | Antecedente plasmático de la tromboplastina |
| XII                                  | Factor Hageman                              |
| XIII                                 | Factor estabilizador de la fibrina (FSF)    |

## **Formación de trombina**

El *activador de protrombina* (protrombinasa) es un complejo enzimático formado por el Xa, iones Ca<sup>2+</sup>, fosfolípidos de origen tisular o plaquetario y el factor V. La formación de este complejo se puede alcanzar por dos vías diferentes, aunque estrechamente relacionadas: la vía extrínseca en la que el proceso se pone en marcha por un daño tisular y la vía intrínseca, por el contacto de la sangre con una superficie diferente al revestimiento endotelial intacto de la pared vascular; de cualquier manera, la formación del activador de protrombina es necesaria para la siguiente fase del proceso, esto es, la conversión de la protrombina en trombina. Ambos mecanismos o vías, deben considerarse como sistemas complementarios y nunca competidores, ya que su existencia garantiza la reparación de los traumatismos a que están expuestos los vasos sanguíneos.

### **Vía extrínseca**

La vía principal para el inicio de la coagulación sanguínea “*in vivo*” es la extrínseca, la cual contiene componentes tanto de la sangre como de los elementos vasculares. El componente fundamental de esta vía es el factor tisular (FT); una proteína intrínseca de membrana compuesta por una única cadena polipeptídica que funciona como cofactor del factor VIII en la vía intrínseca y del factor V en la vía común (Figura 2). El inhibidor de la vía del factor tisular es una proteína que en asociación con el factor Xa inhibe los complejos del factor tisular-factor VII (Rao y Rapaport, 1987; Broze et al., 1988). La síntesis del factor tisular en los macrófagos y en las células endoteliales está inducida por endotoxinas y por citoquinas como la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Colucci et al., 1983; Edwards y Rickles, 1984).

El componente del plasma más importante en la vía extrínseca es el factor VII, uno de los factores dependientes de la vitamina K que son sintetizados como prozimógenos y convertidos (activados) a proteasas séricas por un limitado número de divisiones proteolíticas. La proteína S, que también

es una proteína dependiente de la vitamina K, es un cofactor en lugar de un zimógeno. Estas proteínas tienen en común los residuos del ácido B-glutamil carboxilo (GLA) con un extremo N-terminal, que requiere de la vitamina K para una adecuada síntesis por los hepatocitos. Esta modificación postribosomal de la proteína es necesaria para la unión del calcio (un calcio con 2 grupos carboxilo de un residuo Gla), de tal modo que actúa como un puente para la unión de la proteína a los fosfolípidos de la superficie.

Tanto el factor IX como el factor X se activan por el complejo FT-factor VIIa y el mismo factor Xa. La forma activa se denomina factor de g-glutamil VIIa y representa aproximadamente el 1% del total del factor VII. La interacción entre las vías intrínseca y extrínseca se produce a varios niveles de la cascada de la coagulación. El zimógeno del factor VII tiene mínima pero definitiva actividad proteasa y es capaz de su autoactivación. Esto convierte tanto al factor VII como al VIIa con lo que muestra efectos de retroalimentación tanto positivos como negativos.

El factor VIIa, complejo factor tisular enzimático, que se ensambla con el monocito activado o las células endoteliales alteradas, tiene dos substratos principales, el factor IX y el factor X, ambas proteínas son dependientes de la vitamina K. El cofactor necesario para que el factor IXa catalice la conversión del factor X al factor Xa es el factor VIII, mientras que para la conversión de Xa protrombina en trombina es el factor V. El factor VIII está en el plasma principalmente como un complejo no covalente con el FvW, y su función dentro de la coagulación es acelerar la conversión del factor IXa del factor X a Xa.

### **Vía intrínseca**

La vía intrínseca podría definirse como la coagulación que es iniciada por componentes contenidos dentro del sistema vascular. El proceso se inicia con un traumatismo a la propia sangre o el contacto de ésta con una superficie diferente a la del endotelio del vaso sanguíneo, produciéndose la activación del FXII (de contacto) y continuando con una serie de reacciones enzimáticas en cascada que concluyen con la formación del FXa que, con fosfolípidos

plaquetarios,  $\text{Ca}^{2+}$  y factor V constituyen el activador de protrombina (Figura 2). Se trata de una vía más lenta que la anterior. Este mecanismo se pone en marcha cuando se trabaja con sangre extravasada en el laboratorio.

Este proceso está precedido de la activación del factor IX, una proteasa sérica dimérica, lo que proporciona una vía independiente para el factor VII de la coagulación de la sangre. Sin embargo, una diferencia importante existe entre las dos vías en la cascada de la coagulación. Si consideramos que la activación de factor IX, por XIa sólo requiere la presencia de calcio ionizado, la activación del factor IX por VIIa requiere calcio y el cofactor de la proteína, el factor tisular, incrustado en una celda de la membrana (bicapa lipídica).

El papel de las proteínas del sistema de contacto en la iniciación de la vía intrínseca de la coagulación es discutible, ya que sólo una deficiencia de factor XI se asocia con una tendencia hemorrágica. Estas proteínas participan en cambio, en la iniciación de la respuesta inflamatoria, la activación del complemento, fibrinólisis, la angiogénesis (Colman et al., 2000), y la formación de quinina (Colman, 1999), y los estudios demuestran que el quininógeno es una proteína anticoagulante in vivo (Colman et al., 1999). El mecanismo puede ser la inhibición de la unión de bajas concentraciones de trombina a la GP Ib / IX de las plaquetas (Bradford et al., 1997). El sistema de contacto se implica cuando la sangre interactúa con una superficie exterior, como en el bypass cardiopulmonar. El factor de zimógeno XII (factor de Hageman) es la primera proteína en la serie de reacciones fuertemente reguladas y se une a superficies cargadas negativamente como el caolín, sulfato de dextrano, y sulfátidos. La cadena pesada del factor XII se une a la superficie, lo que permite un gran aumento en la concentración local de la enzima, su autoactivación, y la acción sobre sus sustratos, precalicreína y el factor XI, para formar calicreína y el factor XIa (Mandle et al., 1976). En la mayoría de las enzimas de la coagulación, la cadena ligera contiene los lugares activos de residuos de serina, histidina y ácido aspártico, y es homóloga a la proteasa sérica arquetipo quimotripsina, mientras que la cadena pesada contiene regiones vinculantes a las superficies, fosfolípidos, membrana celular y tejido conjuntivo, los cuales definen el único papel de cada enzima proteolítica de la coagulación.

Recientemente, se ha observado que la ausencia del factor XII en el sistema de coagulación, no altera el proceso fisiológico de la hemostasia (Hack, 2000).

El ensamblaje de un cofactor, la enzima y el sustrato es un proceso constante en la coagulación de la sangre, resultando en la máxima eficiencia y velocidad de las reacciones moleculares, especialmente como un fosfolípido o membrana celular que proporciona la superficie para una posición eficiente de interactuar de los complejos enzimáticos con los sustratos proenzima.

La regulación de retroalimentación negativa es una característica del sistema de coagulación. Una de estas reacciones es el factor de división XIa de la cadena ligera HK, que contiene la actividad coagulante, destruyendo así su actividad cofactor y permitiendo al factor XIa para disociarse de la superficie activa (Scott et al., 1985). Del mismo modo, la trombina activa los factores V y VIII, pero sin embargo, la conversión de la proteína C en proteína C activada conduce a la destrucción de los factores Va y VIIIa. Aunque la deficiencia de cualquiera de las tres proteínas implicadas en la vía del sistema de contacto resulta en la generación lenta de trombina y un tiempo parcial de tromboplastina in vitro prolongado, su efecto in vivo parece no estar relacionado o ser lo contrario. HK es una proteína con función antitrombótica después de la lesión endotelial (Colman, 1999), y una deficiencia puede predisponer a la trombosis. La deficiencia del factor XII, ha sido implicada como un factor de riesgo venoso y tal vez la trombosis arterial (Halbmayer et al., 1992), por lo que podría ser un anticoagulante natural.

### **Vía común**

Una vez que el factor Xa se ha formado, ya sea por la vía extrínseca o la intrínseca, la protrombina se convierte en trombina (Figura 2). Al igual que con los otros factores dependientes de la vitamina K, la protrombina tiene diferentes ámbitos funcionales dedicados a la unión del calcio a fosfolípidos (10 residuos Gla en la porción N-terminal). Esta región se asemeja al factor de crecimiento epidérmico que contiene ácido C-hidroxiaspártico o asparagina, la cual puede unir el  $\text{Ca}^{2+}$  a una región de interacción del cofactor (factor V), una región de



activación del péptido, y una parte que contiene el centro catalítico. Los niveles elevados de protrombina se deben a una mutación en la región sin traducir, G20120A, siendo esta una causa genética que puede dar lugar a un estado de hipercoagulabilidad (Poort et al., 1996).

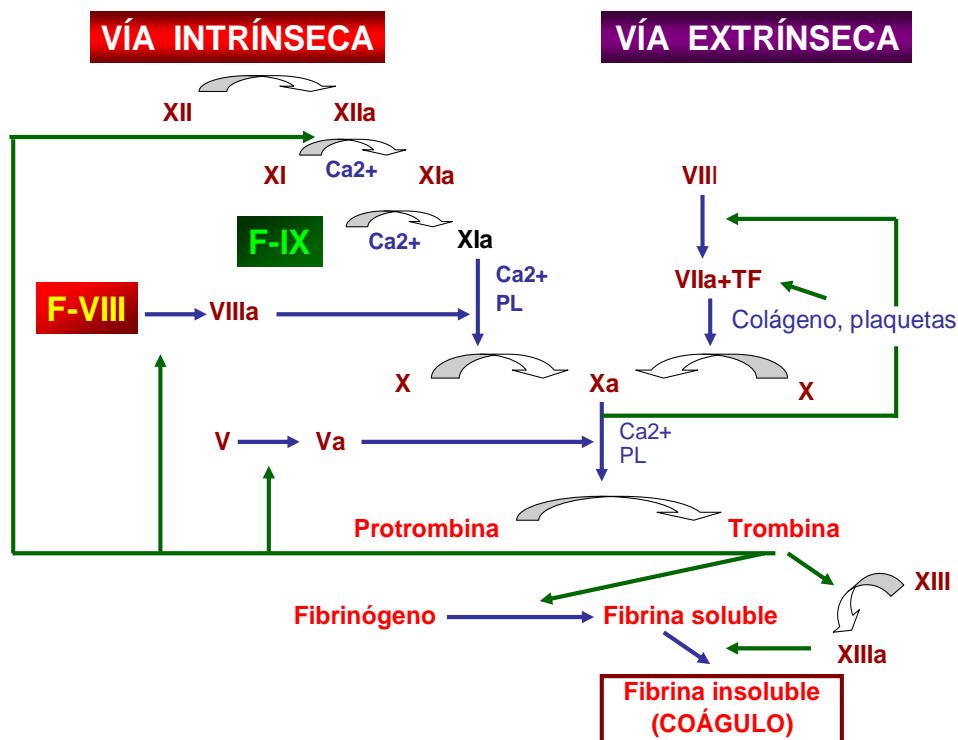
Después de la escisión adecuada de la protrombina por el factor Xa, la parte Gla N-terminal se retira, y las dos cadenas resultantes de moléculas de trombina se separan de la superficie de los fosfolípidos. La interacción de los cuatro componentes del complejo protrombinasa (factor Xa, factor V, fosfolípidos, y calcio), establece una tasa incrementada significativamente de la activación de protrombina de más de 300.000 veces más que lo que sólo se logra con la enzima (factor Xa) y sustrato (protrombina). Así, el factor V que participa en este "complejo protrombinasa" en la membrana de las plaquetas se presenta como el resultado de su secreción de las plaquetas o la fusión con la membrana plasmática, y sirve como un receptor para el factor Xa uniéndose a la plaqueta activada (Miletich et al., 1978). Debido a esta participación de las plaquetas, las manifestaciones clínicas de deficiencia de factor V pueden parecerse a los trastornos cualitativos de las plaquetas. Las vías alternativas para la activación de la protrombina por el factor Xa independientes del factor V se han descrito en las células malignas, células endoteliales hipóxicas y los macrófagos (Gordon y Cross, 1981). Las proteínas de la coagulación de la sangre pueden estar agrupadas de acuerdo a las propiedades que comparten, a sus actividades, o a su localización. Por ejemplo, las enzimas fosfolipídicas requieren una carboxilación (dependiente de la vitamina K) de residuos del ácido glutámico en sus dominios N-terminal, y procofactores sin actividad enzimática que facilitan la colocación y la interacción de los factores de la coagulación en las superficies biológicas. Otro grupo de factores incluye a aquellos que sirven de sustrato para la trombina: por ejemplo, cofactores V y VIII (activada, desactivada), proteína C (activada), la protrombina (escindida de pretrombina), proteína S (inactivada), el factor XIII (para formar factor estabilizador de la fibrina activo), y el fibrinógeno (liberación del fibrinopéptido).

Además, la deficiencia del factor VIII o IX produce la misma alteración clínica (formación de fibrina deficiente y un coágulo inestable) en virtud de su

cooperación en el complejo "tenasa" (hemofilias A y B). También, el factor V, el fibrinógeno y las proteínas de adhesión de la fibronectina, FvW y trombospondina están todas almacenadas en los gránulos de las plaquetas.

El mapeo del genoma humano completo ha descubierto nuevas relaciones entre los viejos emparejamientos de proteínas de la coagulación. Así por ejemplo hay mutaciones en el gen LMANI (Nichols et al., 1998) que conducen a defectos en el procesamiento del factor V y VIII en el sistema ER-Golgi subcelular, explicando la deficiencia combinada de estos cofactores de la coagulación. Igualmente, la deficiencia de la vitamina K epóxido reductasa (Li et al., 2004) conduce a la resistencia a la warfarina de los factores II, VII, IX y X. Otro importante gen hemostático recientemente descubierto (Levy et al., 2001) es ADAMTS, que controla la ruptura proteolítica de multímeros FvW; la deficiencia de ADAMTS está asociada con púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). Inhibidores proteolíticos del plasma sirven para limitar y controlar el grado y la velocidad de coagulación de la sangre y las reacciones fibrinolíticas.

**Figura 2.-** Cascada de la coagulación sanguínea. Vías extrínseca, intrínseca y común.



### ***La formación de fibrina***

La trombina actúa sobre múltiples sustratos, incluyendo el fibrinógeno, los factores XIII, V y VIII, la membrana plaquetaria GP V, la proteína S y la proteína C (Figura 3). De este modo, la trombina ocupa un papel central en el proceso de formación de tapón hemostático, que influyen en su forma, la tasa de formación, y su limitación. Su efecto potenciador sobre los factores VIII y V produce un aumento de la “tenasa” y los complejos protrombinasa, lo que resulta en un estallido de actividad de la trombina y la formación de la línea de fibrina. La causa genética más común de trombosis se produce cuando la trombina hidroliza el factor V muy lentamente debido a una mutación puntual en un sitio de corte (factor de trombosis V<sub>Leiden</sub>) (Bertina et al., 1994).

La trombina también ayuda a reclutar plaquetas para el tapón hemostático, dependiendo de las influencias relativas de los sistemas de coagulación intrínsecos o extrínsecos que estén operativos. Cuando se inicia la coagulación principalmente en la superficie plaquetaria alterada (vía intrínseca), la formación de trombina es más lenta que cuando la vía de coagulación extrínseca se inicia por la exposición al factor tisular, una proteína de membrana que se encuentran en los macrófagos, células endoteliales activadas, y las células tumorales. En este último caso, la trombina puede tener una mayor influencia en la agregación plaquetaria.

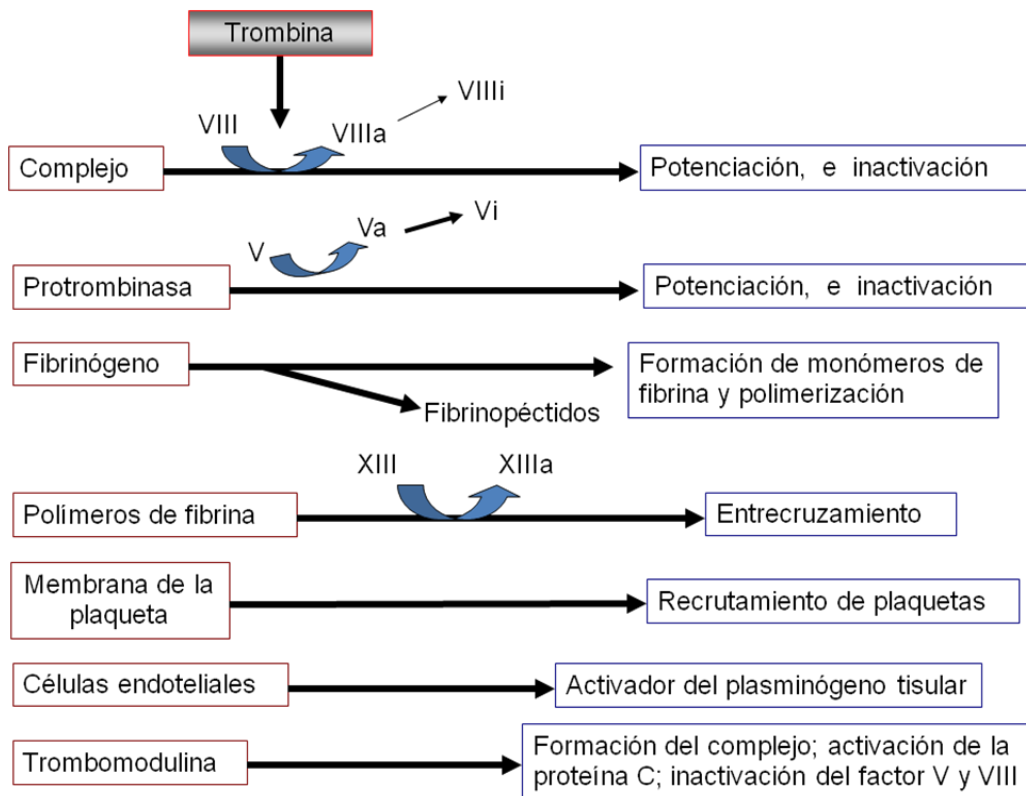
La formación de los filamentos de fibrina representa la segunda fase en la hemostasia (la primera empieza con el primer agregado de plaquetas). El precursor de la fibrina es el fibrinógeno, una gran glicoproteína dimérica (340.000 Da) presente en alta concentración en plasma y en los gránulos de las plaquetas, y que interactúa con otras proteínas, como el factor XIII, alfa2-plasmina, fibronectina, inhibidor del plasminógeno y del activador del plasminógeno (Doolittle et al., 1978). La ubicación y la concentración de la superficie de estas proteínas modificadas influyen en el proceso ordenado de la formación de la fibrina, el entrecruzamiento y la lisis de la fibrina. La trombina se une al dominio central del fibrinógeno y libera fibrinopéptidos A y B, dando

lugar a monómeros de fibrina y a la formación de polímeros (Blomback y Blomback, 1972). El alargamiento progresivo de la cadena del polímero se produce por una superposición, la aproximación de lado a lado de las moléculas del monómero de fibrina, y las dos cadenas de protofibrillas que interactúan lateralmente para formar cadenas largas, delgadas o cortas y bandas anchas de la fibrina (Ferry, 1952; Hermans y McDonagh, 1982).

Aunque el grado de agrupamiento de los filamentos probablemente contribuye a la resistencia de la tracción del coágulo, su resistencia a la degradación de la plasmina está principalmente influenciada por el entrecruzamiento inducido por el factor XIIIa (Robbins, 1944). Además, el factor XIIIa, vinculando al inhibidor plasmina- $\alpha$ 2 de la fibrina, puede proteger al coágulo contra la fibrinólisis. El factor XIII existe en el plasma como una cuarta cadena precursora de moléculas de 340.000 daltons, y después de la activación de la trombina, la enzima (con calcio) induce el entrecruzamiento de los polímeros de fibrina (Schwartz et al., 1973).

Los enlaces covalentes isopeptídicos se forman entre los grupos de lisina y los receptores de glutamina, con dos  $\gamma$  (gamma) entrecruzamientos rápidamente para formar dímeros  $\gamma$ - $\gamma$ ; cadenas alfa que son entrecruzadas más lentamente, cada uno con dos cadenas de cualquier otro, para formar una red de polímeros (Mattock y Hill, 1970, Folk y Finlayson, 1977). En las formas maduras, las fibras de fibrina contienen aproximadamente 100 protofibrillas, con un patrón de ramificación variable que une a las fibrillas entre sí.

**Figura 3.** Funciones de la trombina.



La malla de fibrina une a las plaquetas entre sí y contribuye a su fijación a la pared del vaso, todo ello mediado por su unión a los receptores de las glicoproteínas de plaquetas y por interacciones con otras proteínas de adhesión como la trombospondina, la fibronectina y el fibrinógeno plaquetario (liberado de los gránulos de las plaquetas) (Kaplan et al., 1979). Después de la adhesión a los sitios de unión de las plaquetas, estas proteínas pueden servir como puentes moleculares entre las proteínas del plasma y el interior de las plaquetas, entre las plaquetas y la pared del vaso, y entre las fibras de fibrina del plasma y la matriz subendotelial.

Por ejemplo, la fibronectina se entrecruza a la fibrina por el factor XIIIa, y se separa de su sitio de unión para usar el colágeno como puente de fibrina y unirse a la pared del vaso (Mosher, 1976; Ruoslahti et al., 1979). El FvW también puede servir como un puente entre membrana plaquetaria GP Ib y un componente de la matriz subendotelial (Wagner et al. 1984). Además, la

membrana plaquetaria GP IIb / IIIa podría unir el fibrinógeno plasmático a la actina intracelular, lo que mediaría la retracción del coágulo y la constricción de la pared del vaso (Nachmias et al., 1977).

Existe una gran variedad de enfermedades hemorrágicas o trombóticas que resultan de las alteraciones en la estructura del fibrinógeno, o de la concentración o la interacción con la trombina o del factor XIII. Por ejemplo, una de estas patologías puede manifestarse como una proteína no polimerizada, por liberación lenta o ausente de un fibrinopéptido, o como una forma inadecuada de fibrina entrecruzada (McDonagh y Carrell, 1993). Esta última situación puede ser producida por la ausencia o defectos en el factor XIII, que podrían contribuir tanto a una condición hemorrágica como a una cicatrización de heridas inadecuada. Los trastornos adquiridos del fibrinógeno más comúnmente encontrados son los del consumo excesivo, la coagulación intravascular diseminada (CID), los síndromes, que reflejan una coagulación excesiva o inadecuada o la degradación proteolítica del fibrinógeno del plasma y puede resultar en una variedad de manifestaciones hemorrágicas y trombóticas, dependiendo en gran medida en el proceso patológico subyacente (Marder et al., 1993).

Existen varios mecanismos para el control y la localización de la hemostasia, incluyendo los efectos del flujo vascular y la hemodilución, la retroalimentación proteolítica por la trombina, la inhibición por las proteínas del plasma y la activación de un inhibidor de la enzima proteína C (localizado en las células endoteliales), y la fibrinólisis. En primer lugar, el tapón hemostático se expone a la perturbación del flujo sanguíneo, y como consecuencia, pequeños grupos de plaquetas que se encuentran inadecuadamente unidos al agregado plaquetario o la pared del vaso se pueden soltar y quedar libres en la sangre. En segundo lugar, la trombina que está presente en el tapón hemostático y que ha contribuido a su formación al potenciar la activación de los factores V y VIII, también podría inactivar estos mismos cofactores, en presencia de trombomodulina, una proteína de membrana de las células endoteliales. Este complejo efecto de la trombina es un sencillo ejemplo de autocontrol que limita el crecimiento del tapón de plaquetas y fibrina. En tercer

lugar, las proteínas coagulantes solubles que están activadas, como el factor Xa o la trombina se pueden propagar y distanciar del coágulo, y con ello unirse a proteínas inhibitoras que destruyen o al menos disminuyen notablemente su potencial de coagulación. Entre los principales inhibidores de este tipo está la antitrombina III (ATIII), que forma un complejo no solamente con la trombina sino también con otras proteasas séricas de proteínas coagulantes, como la enzima fibrinolítica plasmina.

Sin embargo, a pesar de que la trombina puede ser fácilmente inactivada por la ATIII en solución, el sitio catalítico de la trombina es inaccesible para el inhibidor mientras que la enzima está unida a la fibrina, y puede conservar la capacidad de escindir fibrinopéptidos incluso en presencia de heparina. En cuarto lugar, la trombina, que al difundirse en la superficie de las células endoteliales puede unirse a un receptor específico, trombomodulina, lo que pone en marcha otro sistema de retención sobre la coagulación local. Como se señaló anteriormente, el complejo trombina-trombomodulina sirve como receptor de proteína C que depende de la vitamina K, que se activa y se libera de la superficie de la célula endotelial. La proteína C activada reacciona con los factores V y VIII para destruir sus propiedades coagulantes, lo que limita el efecto de la trombina. En los pacientes con deficiencias de proteína C, proteína S (un cofactor de la proteína C) y ATIII se ha visto que el proceso hemostático no está realmente limitado y tienen gran tendencia a enfermedades tromboembólicas.

### ***La Fibrinólisis***

El último mecanismo para limitar la formación de coágulos es la fibrinólisis, que también constituye un mecanismo de reparación, junto con el nuevo crecimiento de células endoteliales y recanalización del vaso. La fibrinólisis se asemeja al mecanismo de cascada de activación del factor de coagulación, ya que implica conversiones del zimógeno a enzima, la potenciación de la retroalimentación, y un equilibrio mediado por inhibidores. El precursor inactivo de la proteína es el plasminógeno, que está presente en el plasma al doble de la concentración molar del inhibidor. Durante los primeros

períodos de formación del tapón hemostático, las plaquetas y las células endoteliales liberan activadores e inhibidores del plasminógeno que facilitan la formación de fibrina (Plow y Collen, 1981). Sin embargo, en respuesta a una sincronizada y organizada secuencia de estímulos, las células endoteliales también liberan el activador tisular del plasminógeno (Levin et al., 1984). Ambos activadores tisulares del plasminógeno y la prourocinasa tienen la capacidad de convertir el plasminógeno (especialmente una molécula del plasminógeno que está unida a la fibrina) a la forma activa de la proteasa sérica, la plasmina (Lijnen y Collen, 1982).

Al igual que con el mecanismo de retroalimentación de la trombina, que conduce a la formación del factor Xa, la plasmina también ejerce una retroalimentación positiva, lo que la hace más susceptible a unirse a la superficie y posterior activación de los activadores del plasminógeno. Por otro lado, se puede considerar más crítica la reactividad elevada del plasminógeno después de que se haya unido a la fibrina. La lipoproteína A, con los múltiples anillos de la histidina también modula las interacciones entre fibrina-plasminógeno por medio de la inhibición del plasminógeno unido a la fibrina (Lijnen et al., 1980; Mao y Tucci, 1990).

Aunque sólo una pequeña proporción del plasminógeno del plasma se une a la fibrina durante la formación de los coágulos, esto es suficiente para inducir la fibrinólisis fisiológica (Alkjaersig et al., 1959). El tiempo y el grado de disolución del coágulo se ven afectados por la proporción y la posición del plasminógeno profibrinolítico, así como por las moléculas del activador del plasminógeno y las moléculas inhibitoras antifibrinolíticas de la plasmina- $\alpha$ 2. Los signos clínicos relacionados con los trastornos moleculares incluyen un trastorno hemorrágico debido a la deficiencia o estado defectuoso del inhibidor de la plasmina- $\alpha$ 2 y el PAI-1 (Aoki et al., 1978). Varios estudios han dilucidado una importante conexión entre la coagulación y vías fibrinolíticas en virtud de la mediación entre la trombina y la trombosmodulina de proteínas C y la activación de TAFI (Boffa y Koschinsky, 2007). Mientras que la activación de la proteína C lleva a la inactivación de los factores Va y VIIIa y a la reducción de la formación de coágulos futuros, la activación de TAFI promueve la



estabilización de la fibrina y por lo tanto los coágulos de fibrina ya formados. La función de TAFI consiste en unirse a los residuos de lisina C-terminal de la fibrina, de tal modo que previene la unión del plasminógeno, la plasmina, y los activadores tisulares del plasminógeno (tPA) a la fibrina; y en segundo lugar, la inhibición de la fibrinólisis.

En condiciones clínicas de reducción de la coagulación, como en la hemofilia clásica, no sólo son deficientes en la formación de trombina y fibrina, pero, en virtud de la baja formación de TAFI (Boffa y Koschinsky, 2007), permiten al proceso fibrinolítico avanzar sin obstáculos. La combinación de menos fibrina y más lisis contribuye a la hemorragia observada en pacientes con deficiencia de factor VIII. Del mismo modo, los pacientes con deficiencia de coagulación inducida por contacto también parece que tienen disminuida la activación de TAFI, tal vez por una inadecuada coagulación después de la formación inicial de la fibrina. Por otro lado, pacientes con deficiencia de la proteína C manifiestan una tendencia trombótica en virtud de un fracaso de la inhibición por retroalimentación de los factores Va y VIIIa por la trombina. La predilección a la trombosis puede también tener una contribución excesiva a la formación de TAFI debido a la continua producción de trombina. En este caso, no sólo se forman trombina y fibrina, sino que también la fibrina formada es mucho más resistente a la lisis de plasmina por TAFI (Boffa y Koschinsky, 2007).

Una vez que la plasmina es producida localmente alrededor del tapón hemostático, la degradación de fibrina puede comenzar. El coágulo se va a reducir gradualmente mediante un complejo equilibrio entre las fuerzas de la coagulación y de la agregación plaquetaria, la inhibición de la coagulación, las reacciones profibrinolíticas y antifibrinolíticas y los mecanismos celulares para la coagulación y la lisis (en los leucocitos como así como en las plaquetas y células endoteliales). La proteasa neutra sérica (elastasa) liberada de los gránulos primarios de los neutrófilos también contribuye a la fibrinólisis local (Plow, 1982). La superficie del coágulo puede ser eliminada primero, y esta es seguida por capas que han sido progresivamente adheridas hasta que el proceso está completado (Francis et al., 1980). Durante la disolución del tapón

hemostático o el trombo, los productos de degradación de la fibrina solubilizada, son liberados a la circulación. Algunos de estos productos representan una red única de derivados como el dímero-D que se pueden distinguir de los productos de degradación del fibrinógeno (Kopec et al., 1973). Los productos de degradación circulantes son marcadores de la trombina o el factor XIIIa siendo usados en el diagnóstico de coagulopatías. La superficie del coágulo de fibrina y los derivados de la fibrina circulante pueden poseer una cantidad pequeña pero significativa de la trombina activa que puede servir para propagar el mecanismo de coagulación en la circulación (Francis et al., 1983). Las moléculas de plasmina activa también puede ser liberadas a la circulación durante la fibrinólisis, y así como la trombina libre es neutralizada por la ATIII, la plasmina es extremadamente susceptible en solución y puede inhibir la neutralización por el inhibidor (Collen, 1980). Esta última reacción sirve para limitar la fibrinogenolisis a la región del coágulo, así como la ATIII sirve para prevenir la coagulación diseminada por la propagación de un proceso hemostático regional.

Cuando la formación del tapón hemostático es defectuosa (por ejemplo, en la hemofilia), la fibrinólisis fisiológica puede agravar la hemorragia; por el contrario, en estos casos, el uso de ácido aminocaproico (un agente antifibrinolítico que inhibe la plasmina) ayuda en la hemostasia. Este mecanismo también se puede aplicar en el sangrado después de una infusión de dextrano, deficiencia de la antiplasmina- $\alpha_2$ , y la deficiencia de factor XIII. En este último caso, la falta de enlaces cruzados conduce a una mayor susceptibilidad a la plasmina y al fallo de la exposición de la antiplasmina con al coágulo de fibrina, lo que también puede dar lugar a un incremento de la fibrinólisis y la hemorragia.

Este complejo proceso donde están implicadas tanto las células endoteliales y las plaquetas, como los factores de coagulación, las proteínas de adhesión, los mecanismos inhibidores de la coagulación, la fibrinólisis y la agregación plaquetaria, sirve para mantener el equilibrio entre la hemostasia y su recuperación. Este sistema, altamente desarrollado, permite una respuesta rápida y eficaz a la hemorragia pero evita que se desarrolle un proceso

trombogénico desde el lugar de la lesión, y que el proceso persista más allá de lo fisiológicamente necesario. Una alteración producida a cualquier nivel del complejo proceso puede producir un desequilibrio, que conlleve a un trastorno resultante en signos clínicos de hemorragia o trombosis. Una característica que complica aún más este delicado equilibrio es la intervención terapéutica, que debe ser cuidadosamente regulada para corregir un defecto hemostático sin alterar el equilibrio, ya que ello puede llevar al desarrollo de una trombosis.

A continuación y una vez revisados los conceptos básicos de la fisiología de la hemostasia, vamos a pasar a detallar las pruebas y técnicas para la evaluación de la coagulación en pacientes clínicos, con especial atención en las pruebas disponibles en veterinaria.

### **3.2.- EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA**

Para el correcto enfoque diagnóstico de los trastornos de la coagulación, es fundamental la realización de una buena anamnesis y exploración física minuciosa del paciente. Los datos clínicos, signos y síntomas, antecedentes hemorrágicos, o historia de coagulopatías, pueden resultar de gran ayuda para un primer enfoque diagnóstico. Además también disponemos de una completa batería de analíticas y pruebas complementarias, que permiten conocer el alcance y la gravedad de la enfermedad.

#### ***3.2.1 Evaluación de la hemostasia primaria***

Para el estudio y caracterización de los trastornos de la hemostasia primaria, vasos y plaquetas, contamos con las pruebas de contaje plaquetario y de la función plaquetaria. Seguidamente pasamos a describir el procedimiento para desarrollar dichas pruebas:

Contaje plaquetario: El número de plaquetas es calculado por  $\mu\text{L}$  ( $\times 10^9/\text{L}$ ) de sangre, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Total de plaquetas contadas} \times \text{factor de dilución} \times [1/\text{factor volumen (área} \times \text{profundidad)}] = \text{células}/\text{mm}^3$$

El contaje se realiza en sangre entera, la cual es diluida en una solución de oxalato amónico al 1% (Rutherford, 1995). Con esta dilución se lisan todos los eritrocitos manteniendo intactos los leucocitos, plaquetas, y reticulocitos. La dilución estándar necesaria para el contaje plaquetario es de 1:100, y el contaje se realiza con la cámara de Neubauer, utilizando solamente el cuadrado central ( $1 \text{ mm}^2$ ) y el objetivo de 40 aumentos. Un segundo método para el contaje manual es el método de Rees-Ecker. Para este método, la sangre entera es diluida a una concentración de 1:100 con la solución de Rees-Ecker, la cual contiene azul de cresilo brillante. Este colorante tiñe las plaquetas de un color azul refringente facilitando su contaje (Burns, 2004a).

Tiempo de sangrado de mucosas: Es una prueba realizada *in vivo*, donde se mide el tiempo necesario para el cese de una hemorragia causada por un pequeño corte en la piel o mucosas. Esta prueba evalúa específicamente la función plaquetaria, viéndose alterada por varios factores como el número de plaquetas, funcionalidad de las plaquetas, y la integridad vascular. Otros factores a tener en cuenta, cuando se realiza este test, son la profundidad, localización y dirección de la incisión, así como el grosor de la piel, ya que todos ellos influenciarán en mayor o menor medida los resultados (Mielke, 1984).

Existen distintos métodos para la realización de este test. El más antiguo descrito, el método de Duke, consistía en la realización de un corte en el lóbulo de la oreja con una lanceta. En 1941, este método fue mejorado por Ivy, quién creó una presión constante en el antebrazo mediante un manguito de presión (40 mmHg) y realizó la incisión en el antebrazo. A día de hoy, este es el método todavía utilizado, aunque con la utilización de un boceto estándar para

realizar la incisión siempre del mismo tamaño y profundidad. El intervalo general de referencia para esta prueba son entre 1 y 9 minutos (Burns, 2004b).

Los pacientes, a los que se les va a realizar esta prueba, no deben recibir ningún tipo de terapia anticoagulante. Además, la realización de un contejo plaquetario está altamente recomendada debido a su influencia en los resultados.

Agregación plaquetaria: Los estudios de agregación plaquetaria están destinados a la evaluación de la funcionalidad plaquetaria. El procedimiento para el desarrollo de esta prueba se realiza mediante la adición de un reagente (agonista plaquetario) a una suspensión de plasma rico en plaquetas, lo cual resultará en un cambio en la morfología de las plaquetas (Jensen, 1999). Estos cambios propician la agregación plaquetaria, lo que es captado por el agregómetro y expresado en forma de gráfica o curva. Los agregantes más comúnmente utilizados son ADP, epinefrina, colágeno, ristocetina y ácido araquidónico. Dependiendo del tipo de reagente utilizado, la agregación puede presentar una o dos curvas. La primera curva, está establecida por la respuesta directa de las plaquetas al agente agregante, representando la forma de las plaquetas y la formación de pequeños agregados. La segunda curva, representa la agregación completa, fenómeno que ocurre como resultado de la suelta de ADP endógeno por parte de los cuerpos densos de la plaqueta. En los casos donde se observa una curva primaria y otra secundaria, la curva se conoce como curva bifásica, mientras que cuando solo se producen una curva, se conoce como curva monofásica (Burns, 2004b).

Los cambios observados en las curvas de agregación plaquetaria deben ser interpretados para la identificación cualitativa de las anomalías plaquetarias. Por lo general, cada reagente utilizado suele mostrar un patrón típico de agregación plaquetaria. Aunque los resultados están también influenciados por el pH, el tiempo de espera hasta que la muestra es procesada y el contejo plaquetario (Santoro and Evy, 2000).

Analizador de la función plaquetaria (PFA): Este tipo de analizadores están tomando gran popularidad y son usados para evaluar la adhesión y agregación plaquetaria. El aparato realiza una aspiración de sangre citratada bajo una alta fuerza de rozamiento a través de un tubo capilar, y un compartimento que contiene una membrana. Esta membrana contiene una pequeña apertura en el centro revestida con ADP y colágeno o con colágeno y epinefrina. Al pasar la sangre a través de la membrana y su apertura, las plaquetas se activan y empiezan a adherirse y agregarse, resultando en un taponamiento de la apertura en aproximadamente de 1 a 3 minutos. El instrumento mide la reducción en flujo a través de la apertura hasta que el flujo se para por completo, y registra el volumen de sangre. El tiempo de cerrado puede verse afectado por varios factores, como son el conteo plaquetario, hematocrito, medicaciones, FvW, trastornos intrínsecos de las plaquetas, y manejo inapropiado de la muestra sanguínea. Por ello, estos instrumentos no son útiles para la identificación específica de un aspecto particular de la función plaquetaria, y no se pueden usar para distinguir entre una deficiencia del FvW y un trastorno intrínseco de la plaqueta (Segura et al., 2005).

Pruebas adicionales para evaluar la función plaquetaria: Los estudios de la secreción plaquetaria están disponibles en algunos laboratorios de referencia. En ellos se evalúa la secreción del contenido de los gránulos plaquetarios mediante seguimiento de la serotonina-C o ADP mediante un procedimiento de quimioluminiscencia (Santoro and Evy, 2000).

- La citometría de flujo también puede ser empleada para el diagnóstico de anomalías plaquetarias, especialmente el síndrome de Bernard-Soulier y la trombostenia de Glanzmann. Para este propósito, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que son capaces de reconocer las diferentes formas del complejo GPIIb/IIIa y IIb/IIIa, respectivamente (Santoro and Evy, 2000).

### **3.2.2 Evaluación de la hemostasia secundaria**

Las pruebas laboratoriales incluidas en este grupo están destinadas a evaluar los factores de la coagulación, pudiendo también detectar inhibidores. Para una evaluación básica de la hemostasia secundaria, actualmente se

realizan 4 pruebas: el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), el tiempo de trombina (TT) y la concentración de fibrinógeno.

Tiempo de Protrombina (TP): Es una prueba de gran importancia en el diagnóstico de deficiencias (tanto hereditarias como adquiridas) de los factores de la vía extrínseca de la coagulación. Para esta prueba, se realiza una medición del tiempo necesitado por la muestra para coagular, una vez que la muestra ha sido activada. Para la activación, se añade una preparación de factor tisular (un reagente trombina-plastina-calcio) a la muestra sanguínea, lo cual inducirá la formación de complejos factor tisular-factor VII. La formación del coágulo puede ser detectada por métodos ópticos o electromecánicos, mediante el uso de aparatos manuales, semiautomáticos o automáticos. El intervalo de referencia para el tiempo de protrombina es de 10-13 segundos. Los TP pueden verse prolongados debido a la deficiencia de los factores de la coagulación VII, X, V, protrombina, o fibrinógeno, y por la presencia de algún inhibidor (Tabla 1) (Burns, 2004b).

La sensibilidad del TP en la detección de deficiencias varía entre las tromboplastinas comercialmente disponibles, debido mayoritariamente a los diferentes tejidos animales utilizados y a los métodos de preparación de los reagentes. Además, la diferente metodología e instrumentación utilizada por cada laboratorio aumenta la variabilidad de dicha prueba (Burns, 2004b).

Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa): Es una prueba de gran importancia en el diagnóstico de deficiencias (tanto hereditarias como adquiridas) de los factores de la vía intrínseca de la coagulación, así como en la monitorización de pacientes con terapias anticoagulantes y en la detección de inhibidores de la coagulación sanguínea. Los reagentes utilizados en esta prueba son tromboplastina y calcio. El reagente de la tromboplastina parcial activada está compuesto de fosfolípidos, en cuya superficie se producen las reacciones enzimáticas de la cascada de la coagulación y un activador como el kaolin, celite, o ácido elágico que aporta la superficie cargada negativamente para la activación del factor VII. Una vez que la muestra ha estado en contacto

con el primer reagente, el tiempo suficiente para la activación de los factores, añadimos el calcio y medimos el tiempo de coagulación. Al igual que para el tiempo de protrombina, la formación del coágulo puede ser detectada por métodos ópticos o electromecánicos, mediante el uso de aparatos manuales, semiautomáticos o automáticos. El intervalo de referencia general para el tiempo de tromboplastina parcial activada es de 30-40 segundos; una reducción del 25-40% es necesaria para que los TTPa se vean alterados. Los TTPa pueden verse prolongados en diferentes enfermedades o condiciones patológicas, como las presentadas en el Tabla 2.

**Tabla 2.** Patologías o condiciones asociadas a tiempos de coagulación prolongados.

| Patologías o condiciones asociadas a tiempos de coagulación prolongados |
|---|
| Enfermedad de von Villebrand  |
| Síndrome de Bernard-Soulier   |
| Trombastenia de Glanzman  |
| Afibrinogenemia   |
| Hipofibrinogenemia severa   |
| Síndrome de Ehlers-Danlos   |
| Uremia  |

Tiempo de Trombina (TT): Esta prueba de la coagulación mide la conversión del fibrinógeno en fibrina, después de la adición de trombina a una muestra de plasma sin diluir. El reagente de trombina actúa rompiendo el fibrinógeno en polímeros de fibrina. Al igual que en el TP y TTPa, la formación del coágulo puede ser detectada por métodos ópticos o electromecánicos, mediante el uso de aparatos manuales, semiautomáticos o automáticos. El intervalo de referencia general para el tiempo de trombina es de 10-16 segundos. En el caso de que obtengamos un TT prolongado debido a la contaminación de la



muestra con heparina, la adicción de sulfato de protamina, reestablecerá un valor normal para el TT (Parsipanny, 1991).

Concentración de Fibrinógeno (FIB): Se han descrito varios métodos para la cuantificación de la concentración de fibrinógeno, incluyendo los métodos de precipitación o desnaturalización, métodos turbidimétricos, ensayos inmunológicos, medición ultravioleta de la fibrina en el coágulo, y el ensayo basado en el coágulo de Clauss, siendo este último el método de referencia. Según el método de Clauss, la concentración de fibrinógeno es directamente proporcional al tiempo de trombina del plasma diluido, y para su interpretación se prepara una curva de referencia con concentraciones de fibrinógeno conocidas enfrentadas a los tiempos de trombina.

Los resultados de la concentración de fibrinógeno de cada paciente son sacados de la curva de referencia mediante el uso de los respectivos tiempos de coagulación. En general, el intervalo de referencia para la concentración de fibrinógeno es de 150-350 mg/dL. Un factor a tener en cuenta es que esta prueba mide la formación de un coágulo detectable, por lo que los inhibidores de la polimerización de fibrina (PDF) prolongarán los tiempos de coagulación, causando una estimación baja de la concentración de fibrinógeno artificialmente (Villanova, 1994).

### **3.2.3 Evaluación del sistema fibrinolítico.**

Las anomalías o alteraciones en el sistema fibrinolítico no son detectadas con las pruebas rutinarias de la coagulación como son el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada. Por ello, ante la sospecha de trastornos en este sistema se deben realizar pruebas específicas como las que pasamos a detallar.

Productos de la degradación del fibrinógeno (PDF): El incremento de los productos de la degradación del fibrinógeno refleja un aumento en la actividad fibrinolítica del paciente. Algunas de las patologías en las que frecuentemente se observa una elevación de los PDF son las enfermedades hepáticas y del riñón, complicaciones postquirúrgicas, algunos tumores, infarto cardíaco y otras

enfermedades vasculares, embolismo pulmonar, trombosis, y coagulación intravascular diseminada (CID) (Burns, 2004b).

La detección de los productos de la degradación del fibrinógeno se realiza por medio de una reacción de tipo antígeno-anticuerpo. Para realizar esta prueba es necesario tomar la muestra sanguínea del paciente en un tubo que contenga trombina, para de esta forma quitar todo el fibrinógeno; y un inhibidor de la fibrinólisis, para evitar in vitro fibrinogenolisis. La muestra del paciente se mezcla con partículas de latex revestidas con anticuerpos FDP monoclonales humanos en un porta de vidrio durante un tiempo específico. Al final de este periodo, se observa el resultado de la mezcla al microscopio para ver si ha habido aglutinación (Burns, 2004b).

Dímeros-D: Los dímeros-D son un marcador específico de la degradación de la plasmina, y representan un producto de la degradación de la fibrina generado a partir del factor XIIIa y su entrecruzamiento con la fibrina. Tienen especial relevancia en como marcador de coagulación intravascular diseminada (CID) con fibrinólisis secundaria. Otros procesos patológicos en los que se pueden ver elevados los dímeros-D son el tromboembolismo arterial y venoso, cirugía reciente y/o trauma, cirrosis hepática, y fallo renal.

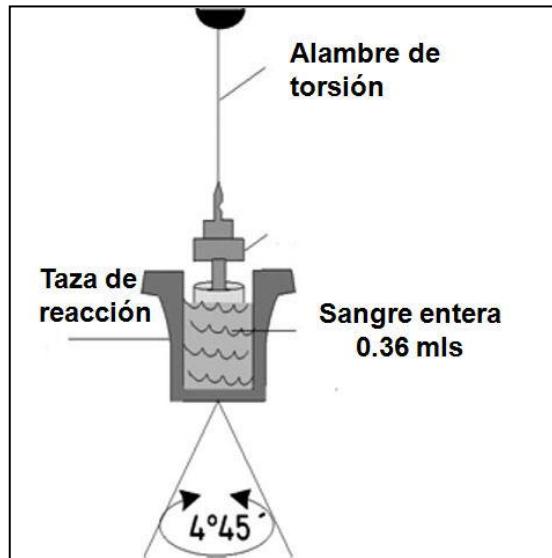
La medición de los dímeros-D puede realizarse en plasma (con citrato, EDTA, o heparinizado) o también con suero. Una vez se ha obtenido una muestra del paciente, esta se mezcla con partículas de latex revestidas con anticuerpos monoclonales (dirigidos contra los dímeros-D) en un porta durante un tiempo determinado. Al finalizar este periodo, la muestra se observa macroscópicamente para la detección de aglutinación. Para una cuantificación de la cantidad de dímeros-D en la muestra sanguínea se realizan diluciones y se repite el proceso (Burns, 2004b) (Armengou et al., 2008).

### **3.2.4 Evaluación de la hemostasia global (Técnicas viscoelásticas)**

Clásicamente, en medicina humana, el sistema hemostático y las coagulopatías han sido monitorizadas mediante el uso de las pruebas rutinarias de la coagulación, como son el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Sin embargo desafortunadamente, estas pruebas rutinarias nunca han sido validadas para la predicción de hemorragia en pacientes clínicos (Proctor and Rapaport, 1961; Shapiro et al., 1942); aunque existe una alta mortalidad entre los pacientes con tiempos prolongados de protrombina y tromboplastina parcial activada, la causa de muerte en estos pacientes no está correlacionada con un sangrado excesivo (Aoki et al., 2000; MacLeod et al., 2003). Esta falta de correlación entre las pruebas rutinarias para la evaluación de la coagulación y la clínica, podría explicarse en base a que dichas pruebas simplemente reflejan una porción aislada del sistema hemostático (Levi and Schultz, 2010). Con el objetivo de suplir el déficit de un método capaz de evaluar el complejo sistema de la coagulación de forma global, surgieron las técnicas viscoelásticas: tromboelastografía (TEG) (Hartert, 1951; Samama, 2001), tromboelastometría (ROTEM) (Innerhofer et al., 2004; Ebinger et al., 2010), y un analizador viscoelástico de la coagulación y de la función plaquetaria (Sonoclot) (Schött et al., 2010; Dallap Schaer et al., 2009).

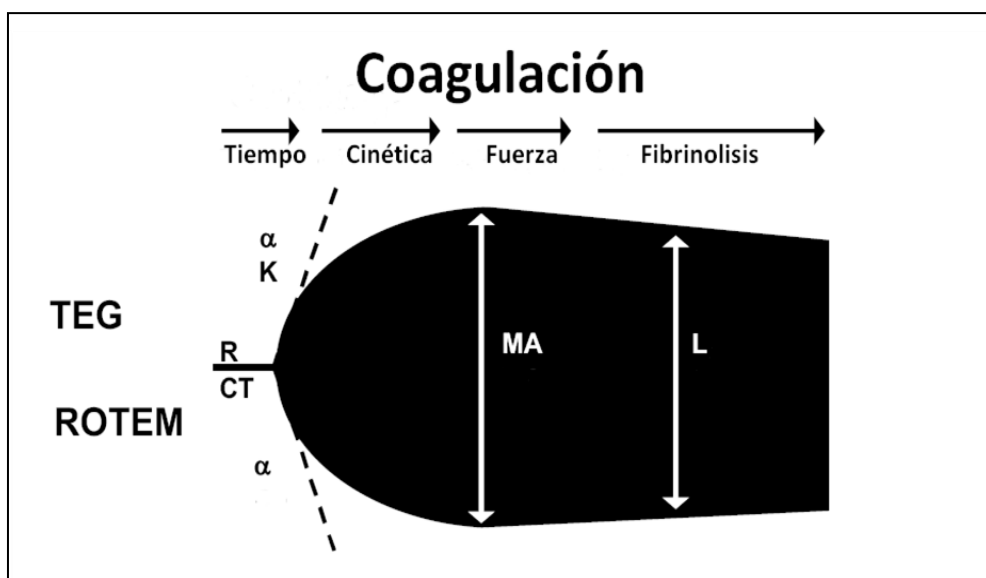
Las técnicas viscoelásticas para la evaluación de la coagulación, son realizadas *ex vivo*, mediante la utilización de sangre fresca sin anticoagulantes, o bien sangre que ha sido previamente citratada y es recalificada antes de su análisis en el laboratorio (Johansson et al., 2009; Johansson et al., 2010). Las muestras sanguíneas son colocadas en una pequeña tacita a 37° C y posteriormente una pequeña clavija se sumerge en la muestra. La medición de la coagulación es realizada por un sistema detector (un alambre de torsión en la TEG y un detector óptico en ROTEM). La tacita y la clavija se encuentran colocadas en un ángulo de 4° y 45'; y una vez comienza el análisis, la tacita comienza a girar en el caso de la TEG (Figura 4), o bien la clavija es quien comienza a realizar los movimientos oscilatorios (en el caso de ROTEM) (Johansson et al., 2009).

**Figura 4.-** Esquema del sistema de acoplamiento de la tromboelastografía.



Una vez el inicio de la coagulación es detectado por los sensores, es transferido al ordenador y el software específico en cada caso, es el encargado de generar una gráfica con toda la información recibida. Dicha gráfica está dividida en varias partes y cada una de ellas refleja los diferentes estados del proceso hemostático (tiempos de coagulación, cinemática, fuerza del coágulo, y fibrinólisis (Figura 5) (Johansson et al., 2009).

**Figura 5.-** Gráfica esquemática de las diferentes etapas de la coagulación evaluadas con tromboelastografía (TEG) y/o tromboelastometria (ROTEM).



### **3.2.4.1 - Desarrollo de la técnica de tromboelastografía (TEG) en humana**

La evaluación de la coagulación mediante la técnica de tromboelastografía ha sido investigada en la especie humana durante más de 50 años. Fue en 1948, cuando el Dr. Hartert hizo la primera mención a la técnica tromboelastográfica como un método de evaluación de las propiedades viscoelásticas de la coagulación en sangre entera y en unas condiciones de bajo rozamiento (Hartert, 1948). Posteriormente, la técnica fue detallada más en profundidad en su artículo científico "*Thromboelastography, a method for physical analysis of blood coagulation*" (Hartert, 1951).

Durante los siguientes años, el Dr. Hartert y su equipo, dedicaron gran parte de su investigación a la aplicación clínica de esta técnica y a su estudio en pacientes humanos. Numerosas publicaciones se realizaron en los años 50, en relación a la descripción de la técnica, (Petersen et al., 1954) rangos de referencia en humanos sanos, (Della Santa and Duraffourd, 1954) aplicaciones en el tratamiento de enfermedades (Soares and Parreira, 1958) y monitorización de pacientes con anomalías hemostáticas (Griguer, 1956).

Durante los años 60 y 70, la tromboelastografía tuvo una gran distribución por el panorama internacional y buena aceptación entre diferentes colectivos y especialistas. Dicha prueba se comenzó a utilizar en todo tipo de pacientes con patologías relacionadas con coagulopatías, tanto en su diagnóstico, como en su tratamiento y monitorización. Algunos ejemplos son los siguientes:

- Kiczak, J., Szozda, M. y Wichert, K. (1965). "[Value of trombelastography in the diagnosis of defects of hemostasis in children]." Pediatr Pol **40**(11): 1193-200 (Kiczak et al., 1965).
- De Matteis, F. y G. Barbano (1963). "[The thrombelastogram in coronary disease.]" Minerva Med **54**: 194-202 (De Matteis and Barbano, 1963).

- Besborod'ko, B. N. y G. D. Tishchenko (1971). "[Thrombelastographic evaluation of blood coagulation in patients with bronchial asthma at the time of onset and during the extraparoxymsmal period]." Ter Arkh **43**(3): 48-51 (Besborod'ko and Tishchenko, 1971).

En la actualidad, la tromboelastografía está siendo ampliamente utilizada para la monitorización hemostática en pacientes humanos (Kashuk et al., 2009; Sivula et al., 2009; Powner, 2010; Sharma and Saxena, 2010), y es considerada una herramienta de alta aplicación clínica (Powner, 2010). La cirugía es quizás una de las ramas de la medicina que más partido le está sacando a esta técnica, demostrado por la multitud de estudios que hacen referencia a ella (Aoki et al., 2000; Coakley et al., 2006; Kashuk and Moore, 2009; El Kady et al., 2009; Moganasundram et al., 2010).

En la cirugía cardíaca, la tromboelastografía se ha instaurado extensamente (Cui et al., 2009) y recientes estudios indican que los riesgos de sangrado excesivo post-quirúrgico, pueden reducirse si esta técnica se añade a cualquiera de los modelos ya existente para la prevención en el sangrado post operatorio (Wasowicz et al., 2010). En otro estudio similar, desarrollado en pacientes sometidos a una técnica quirúrgica de bypass de las arterias coronarias que habían sido tratados con antiagregantes plaquetarios, se demostró que la monitorización con TEG es capaz de predecir sangrado postoperatorio excesivo entre estos pacientes (Preisman et al., 2010). Pero a pesar de todos los esfuerzos que se están haciendo para la prevención del sangrado después de una cirugía cardíaca, la hemorragia ocurre en ocasiones (Wasowicz et al., 2009). Una de las posibles terapias para controlar la hemorragia postquirúrgica es la administración del factor de coagulación VIIa; y para la monitorización de dicha terapia, la tromboelastografía ha demostrado ser útil en la predicción de la respuesta del paciente (Wasowicz et al., 2009).

### **3.2.4.2- Desarrollo de la técnica de tromboelastografía en veterinaria**

No fue hasta 1965, 14 años después de la descripción de la técnica y su primer uso en medicina humana, cuando aparecieron las primeras publicaciones incluyendo animales en estudios de tromboelastografía. En concreto fue en la especie canina, donde mostraron los cambios de la coagulación según la tromboelastografía en perros que habían recibido radiación (Serikova and Makhalova, 1965). Desde esa fecha, muchos son los artículos encontrados en la literatura científica relacionando la tromboelastografía y estudios de la coagulación, basados en proyectos experimentales con animales.

En 1966, los Drs. Keck y Sternlicht fueron los primeros científicos en describir el tromboelastograma en medicina veterinaria (Keck and Sternlicht, 1966). Sin embargo, la amplia expansión de la trombolastografía en nuestra profesión veterinaria, se ha producido en los últimos 10 años, introduciéndose en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades de la mayoría de nuestras especies animales domésticas.

### **3.2.4.3.- Desarrollo de la técnica de tromboelastografía en la especie equina**

La tromboelastografía ha sido recientemente introducida en la especie equina mediante varios grupos de investigadores. Por primera vez fue utilizada en un caso clínico de trombostenia de Glanzman en una potra, donde se usó como ayuda al diagnóstico y mediante la comparación del tromboelastograma de un caballo adulto sano como control (Macieira et al., 2007).

Paltrinieri et al. (2008) fueron los primeros autores en publicar una validación de la técnica en caballos sanos. En este estudio los investigadores utilizaron 38 caballos, dividiéndolos en dos grupos; caballos de carreras y caballos de montura. Una sola muestra se tomó a los caballos de montura y dos muestras se tomaron a los caballos de carreras, una antes de la carrera y

otra después. Los objetivos del estudio fueron investigar la precisión del tromboelastógrafo, así como evaluar la influencia de hemólisis, y efectos de la temperatura y el tiempo de almacenaje.

En sus resultados, demuestran que el tromboelastógrafo es un instrumento preciso, dan valores de referencia para caballos adultos y muestran ciertas diferencias entre tromboelastografía en caballos de carreras y caballos de montura. Finalmente, demuestran que tanto la hemólisis de la muestra sanguínea como la temperatura, afectan a los resultados (Paltrinieri et al., 2008).

Seguidamente en 2009, Epstein et al. publicaron una descripción de la tromboelastografía, utilizando el factor tisular, en un intento de reducir la variabilidad que parece presentar esta técnica cuando se realiza con sangre citratada.

En sus resultados muestran que efectivamente el factor tisular era efectivo para ese propósito. Además, un hallazgo no esperado en este estudio fue la gran variabilidad en resultados obtenidos cuando diferentes individuos analizaban la misma muestra. En sus conclusiones realzan la importancia de la estandarización de la técnica para reducir su variabilidad y recomiendan que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia (Epstein et al., 2009).

En este mismo año, Leclere et al. analizaron el efecto del tiempo de almacenamiento de sangre citratada para el análisis posterior mediante tromboelastografía. Para ello, recogieron muestras sanguíneas de 20 caballos adultos sanos para establecer valores de referencia y con 13 de estas muestras, realizaron tromboelastografía a los 30, 60, 90 y 120 minutos. En sus conclusiones, este grupo de trabajo, recomendó el establecimiento de un tiempo determinado entre la toma de la muestra de sangre y su análisis, ya que los resultados obtenidos variaban dependiendo del tiempo de almacenamiento. En esta publicación, los autores sugieren un tiempo fijo de 30 minutos como una buena opción (Leclere et al., 2009).



Recientemente, otra prueba viscoelástica de la coagulación se ha investigado en la especie equina, especialmente en potros neonatos. Dallap et al. (2009) estudiaron un grupo de 30 potros neonatos (menores de 3 días) que se presentaron a la UCI del hospital veterinario debido al grave estado de salud que presentaban. En su estudio, realizaron y compararon la hemostasia de los animales en admisión, a las 24 horas después de la admisión y a las 48 horas después de la admisión, mediante análisis viscoelástico (Sonoclot) y con las pruebas tradicionales de la coagulación (PLT, FIB, PDF y AT). Además, recogieron información acerca de la edad, raza, cultivo sanguíneo, datos clínicos y patológicos y si el animal fue dado de alta o no.

En sus resultados, observaron que los animales que habían sido muestreados en el mismo periodo y presentaban menor formación del coágulo, tenían más posibilidades de morir o ser eutanasiados. También, la identificación de una coagulopatía en la admisión al hospital, y su persistencia a las 48 horas, estaban asociadas con la muerte del potro. Con todo ello concluyeron que la nueva técnica viscoelástica (Sonoclot) podría ser utilizada en la unidad de cuidados intensivos para caracterizar las coagulopatías e identificar los potros que tienen un alto riesgo y un pronóstico pobre (Dallap Schaer et al., 2009).

### ***3.2.5.- Evaluación de deficiencias de factores específicos de la coagulación***

Estas pruebas están indicadas en casos donde la evaluación de la hemostasis secundaria (como la TP y TTPa) ha resultado en parámetros anormales. De esta forma, todos los estudios especializados en los factores de la coagulación y las medidas indirectas de antitrombina y proteína C están basados en las variaciones de TP, TTPa, y TT.

Análisis de un factor para el tiempo de protrombina: Este tipo de análisis se realizan para confirmar la deficiencia de un factor de la coagulación y

determinar su actividad dentro del plasma. La técnica de protrombina realiza una determinación de la actividad de los factores de la cascada de coagulación dentro de la vía extrínseca (factor VII) y la vía común (factores X, V, II). El principio de esta prueba está basado en la habilidad que tiene el plasma de un paciente en corregir un tiempo prolongado de protrombina al ponerlo en contacto con un sustrato deficiente en un factor determinado. Por ejemplo, el sustrato del factor VII se usa para determinar los niveles de actividad del factor VII.

Para dicho procedimiento, se hacen diluciones de un plasma de referencia con un sustrato específico para un factor y se prepara una curva de la actividad de dicho factor. Seguidamente se realiza un TP a la muestra de plasma del paciente a distintas diluciones y empleando un sustrato con la deficiencia del factor (generalmente 1:10 y 1:20) de la muestra a los porcentajes respectivos de referencia de la actividad del factor a estudio. Para la mayoría de los factores, el rango normal de la actividad del factor está entre el 50% y el 150%.

Análisis de un factor para el tiempo de tromboplastina parcial activada: La técnica de tromboplastina parcial activada realiza una determinación de la actividad de los factores de la cascada de coagulación dentro de la vía intrínseca (factor XII, XI, IX, y VIII) y de la vía común (factores X, V, II). El principio de esta prueba está basado en la habilidad que tiene el plasma de un paciente en corregir un tiempo prolongado de protrombina al ponerlo en contacto con un sustrato deficiente en un factor determinado.

Para dicho procedimiento, se realiza un TTPa con diluciones de un plasma de referencia y un sustrato específico para un factor, para de esta forma obtener una curva de la actividad de dicho factor. Seguidamente, se realiza un TTPa a la muestra de plasma del paciente a distintas diluciones y empleando un sustrato con la deficiencia del factor (generalmente 1:10 y 1:20) a los porcentajes respectivos de referencia de la actividad del factor a estudio. Para la mayoría de los factores, el rango normal de la actividad del factor está entre el 50% y el 150%.

Una vez descritas las técnicas y pruebas más comunes para la evaluación de la hemostasia, pasaremos a realizar una revisión bibliográfica detallada de su aplicación en la especie equina, con especial interés en caballos con patologías gastrointestinales y potros neonatos sépticos.

### **3.3.- EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA EN CABALLOS CON PATOLOGÍAS GASTROINTESTINALES**

Varios grupos de investigadores de diferentes nacionalidades han estudiado las alteraciones que se producen en el sistema hemostático de caballos con patologías gastrointestinales. Especial atención se ha prestado al trastorno gastrointestinal más común que sufren los caballos, el “cólico”. También y debido a la gran morbilidad y mortalidad que se produce en los pacientes equinos con colitis, las alteraciones hemostáticas se han estudiado en esta población con detenimiento.

Monreal et al. (2000) estudiaron los cambios de la coagulación y la actividad fibrinolítica en caballos con cólico severo y alto riesgo de desarrollar una coagulación intravascular diseminada (CID). Para ello, evaluaron 41 caballos con cólico y 30 caballos sanos. El diagnóstico de CID lo basaron en el hallazgo de al menos 3 alteraciones en los parámetros estudiados: trombocitopenia, tiempos de coagulación prolongados (TTPa y TP), incremento en los productos de degradación del fibrinógeno (PDF) y reducción de la FIB y antitrombina (AT). Además, también se evaluaron los complejos trombina-antitrombina III en el plasma (TAT), los dímeros-D, y los PDF con la técnica ELISA.

Se realizó un diagnóstico de CID en 16 de los 41 caballos con cólico; cuando se compararon los controles y los caballos con cólico, se encontraron diferencias significativas en los TAT, estando éstos más elevados en los caballos con cólico y CID respecto a los controles y a los caballos con cólico

pero sin CID. También, los dímeros-D estaban significativamente disminuidos en los caballos con cólico y CID. Sin embargo, los PDF se observaban más bajos en los caballos con cólico y CID solamente cuando se compararon al grupo de cólicos que no tenían CID. Además se comprobó una correlación positiva entre los TAT y los tiempos de coagulación (TTPa y TP). El diagnóstico de CID fue asociado con los caballos que no sobrevivieron y con los que presentaban isquemia intestinal.

Los investigadores concluyen que existía un estado de hipercoagulación en los caballos con cólico, y dicho cólico, estaba acentuado en los caballos con CID. La hipofibrinólisis apareció solamente en los caballos con CID (Monreal et al., 2000).

Las alteraciones de la fibrinólisis en caballos con cólico han sido estudiadas por varios grupos de investigación y mediante el empleo de diferentes técnicas. En el 2005, un grupo de investigadores de la Universidad de Cornell, (Stokol et al., 2005) evaluaron la utilidad de unos kits de aglutinación para la detección de los PDF y de los dímeros-D en caballos sanos y caballos con cólico.

Sus objetivos fueron:

- 1) Calcular la sensibilidad y especificidad de los kits para el diagnóstico de CID en caballos; y
- 2) Calcular el valor pronóstico en caballos con cólico.

Para ello incluyeron en el estudio 30 caballos sanos y 20 caballos con cólico severo y CID, realizando en todos los animales un PLT y un panel hemostático. La concentración de PDF fue medida usando diferentes kits de aglutinación. La concentración de los dímeros-D fue medida con tres diferentes kits de aglutinación y un test de inmunofiltración.

Por último, calcularon la sensibilidad y especificidad para los kits en todos los animales, comparando también sus valores entre los caballos con cólico

que sobrevivieron y los que no lo hicieron, para evaluar la utilidad pronóstica.

Los kits para los PDF tuvieron una baja sensibilidad (<40%) y el mejor de los kits para los dímeros-D, tuvo una sensibilidad del 50% y especificidad del 97%. Una alta concentración en dímeros-D fue la tercera anomalía hemostática más comúnmente encontrada. La actividad de la AT fue significativamente más baja y el TTPa prolongado en los caballos que no sobrevivieron.

En conclusión, estos investigadores consideran que los kits para evaluar dímeros-D pueden ser útiles como prueba complementaria en el diagnóstico de CID. Por el contrario, los kits para evaluar los PDF no son válidos para este propósito (Stokol et al., 2005).

La fibrinólisis, además de llevarse a cabo en el sistema vascular y como parte de la hemostasis, también tiene lugar en otros sistemas y cavidades del organismo, donde se forman acúmulos de fibrina. En las patologías digestivas en equinos, y en especial en el síndrome cólico, se ha detectado un incremento en la formación de fibrina y su consecuente actividad fibrinolítica. Por ello, Delgado et al. (2009) estudiaron la utilidad de la concentración de dímeros-D en el líquido peritoneal de caballos con cólico. En este estudio incluyeron 221 caballos con cólico que fueron divididos en diferentes grupos según los tipos de cólico y 15 caballos control. A todos los animales les midieron la concentración de dímeros-D, el activador de plasminógeno tisular y el inhibidor del activador del plasminógeno en la admisión de los caballos al hospital. Además, también midieron la concentración de los dímeros-D en el plasma.

En los resultados, todos los grupos de cólicos tuvieron concentraciones de dímeros-D más altas que los controles; los caballos con enteritis, peritonitis, y problemas isquémicos presentaron los valores más altos. Las concentraciones más altas de dímeros-D en plasma, se encontraron en los caballos con peritonitis, y en los caballos que tenían alterado el análisis del líquido peritoneal (trasudado modificado o exudado). Finalmente, la concentración peritoneal de dímeros-D fue significativamente correlacionada

con una disminución del activador del plasminógeno tisular y un incremento del inhibidor del activador del plasminógeno tisular (Delgado et al., 2009).

Son muchos los investigadores que han estudiado las alteraciones que se producen en la coagulación en los caballos con cólico y otras patologías digestivas. Sin embargo, no son muchas las investigaciones que se han realizado sobre la influencia del tratamiento recibido y su impacto en la coagulación.

Feige et al. (2003) fueron de los primeros investigadores que estudiaron la influencia de la cirugía de cólico en la hemostasis de estos caballos. Para ello, estudiaron la coagulación en 30 caballos con cólico que necesitaron cirugía para resolverlo. También, incluyeron 10 caballos que se sometieron a cirugía para resolver el problema de tragar aire. El tipo de cirugía practicada a estos caballos fue la técnica de Forsell (neurectomía bilateral de la rama ventral del nervio accesorio combinado con la escisión de una porción del músculo homohioideo, esternohioideo y esternotiroideo). En todos los caballos se determinaron los tiempos de la coagulación (TTPa y TP), tiempos de trombina, monómeros de fibrina (MF), dímeros-D, y la AT.

Una vez comparados todos los valores antes y después de la cirugía, el TTPa fue el único parámetro que estaba significativamente prolongado después de la cirugía. Tras la operación, todos los caballos (cólicos y controles) tuvieron un aumento en la FIB. La actividad de la AT se encontraba reducida después de la cirugía de cólico, pero no varió significativamente en el grupo control.

Como conclusión, la activación del sistema de coagulación se produce, no solamente por la patología del cólico, sino también debido en parte a la cirugía en sí (Feige et al., 2003).

Otra de las patologías gastrointestinales más frecuentes encontradas en caballos es la inflamación del colon, también denominada colitis. Este tipo de patología puede comprometer seriamente la vida del caballo si no se establece

un diagnóstico y tratamiento a tiempo. Pero no solamente la causa primaria de una colitis, pone en riesgo la vida de estos animales, sino que también el desarrollo de complicaciones secundarias puede, llevar a un estado crítico y a veces a la muerte. Una de las complicaciones, altamente asociada a casos de colitis severa, es el desarrollo de coagulopatías y trastornos en la hemostasia.

Al igual que anteriormente se realizó en caballos con cólico, Dolente et al. (2002) estudiaron el sistema de la coagulación en caballos con colitis aguda. Su principal propósito fue la detección de CID en estos caballos y determinar si existía alguna asociación entre el diagnóstico de CID subclínica y el resultado final de los pacientes o el desarrollo de complicaciones. Para ello, incluyeron en el estudio 37 caballos con colitis aguda, y realizaron paneles hemostáticos en la admisión, a las 24 y 48 horas. Los paneles hemostáticos incluyeron 6 pruebas diagnósticas: PLT, FIB, tiempos de la coagulación (TTPa y TP), AT, y los PDF.

Los investigadores consideraron un diagnóstico positivo de CID si 3 de las 6 pruebas hemostáticas, estaban fuera de los rangos normales en una misma muestra sanguínea. Doce de los 37 caballos (32%) cumplían los criterios para el diagnóstico de CID subclínica, ya que ninguno de ellos mostró signos clínicos cuando se le tomaron las muestras. El análisis estadístico reveló que los caballos con colitis aguda, tenían 8 veces más posibilidades de morir o ser eutanasiados, si cumplían los criterios para el diagnóstico de CID subclínica.

En las conclusiones de este estudio destacan que un estado de CID es común en caballos con colitis aguda y esto está significativamente asociado con un pronóstico pobre. EL tratamiento de esta CID subclínica, puede influenciar beneficiosamente el resultado final de estos caballos (Dolente et al., 2002).

Otra de las complicaciones más frecuentes vista en caballos con colitis y que está asociada a coagulopatías, es el desarrollo de tromboflebitis en las venas yugulares. Los factores de riesgo que se han encontrado en estos caballos, han sido los siguientes: endotoxemia, salmonelosis, e

hipoproteinemia (Dolente et al., 2005). También y aunque más raramente, infartación y trombosis de las arterias de los miembros distales, puede ocurrir como complicación de un proceso infeccioso del aparato digestivo (Brianceau and Divers, 2001). Brianceau y Divers (2001) publicaron 3 casos de trombosis de las extremidades como causa de enterocolitis, donde especularon que el accidente vascular pudo estar causado por la pérdida de AT, la hemoconcentración y la acidosis que frecuentemente sufren estos pacientes.

### **3.4.- EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA EN POTROS NEONATOS SANOS Y ENFERMOS**

El sistema de coagulación, al igual que otros sistemas del organismo, sufre múltiples cambios y reajustes durante los primeros días de vida en potros sanos. Estos cambios son parte de las alteraciones fisiológicas que prepararan al individuo para su nuevo ambiente.

En 1995, Barton et al. estudiaron los cambios hemostáticos que se producen en potros neonatos sanos desde su nacimiento hasta un mes de vida, y compararon los resultados con los índices hemostáticos de caballos adultos. En el estudio utilizaron 45 potros sanos de varias razas y 20 caballos adultos. A todos los potros les tomaron muestras de sangre en cuatro edades diferentes: 1) < 24 horas, 2) entre 4-7 días, 3) entre 10-14 días, y 4) entre 25-30 días. El panel hemostático que realizaron incluyó: PLT, TTPa, TP, actividad de la concentración de la proteína C, AT, plasminógeno, antiplasmina  $\alpha_2$ , activador del plasminógeno tisular, inhibidor del activador del plasminógeno, el antígeno plasmático de la proteína C, la FIB, y la PDF.

En los resultados destacaron los tiempos prolongados de la coagulación (TP y TTPa) en potros recién nacidos respecto a cuando tenían un mes de edad. Además, los siguientes parámetros presentaban valores más bajos al nacimiento que cuando los potros tenían un mes: AT, plasminógeno, actividad



del activador del plasminógeno tisular, antígeno de la proteína C, y FIB. Sin embargo, las concentraciones de los siguientes parámetros eran significativamente más altas en el nacimiento que cuando tenían un mes de vida: la proteína C, el inhibidor del activador del plasminógeno y la PDF.

Como conclusión, los investigadores establecen que los índices hemostáticos en potros neonatos difieren significativamente de los potros con un mes de vida. A excepción de la AT y el activador del plasminógeno tisular, todos los índices hemostáticos evaluados en este estudio, cuando los potros tenían un mes de vida, eran iguales a los índices de caballos adultos (Barton et al., 1995).

El mismo grupo de investigadores, en 1998 evaluaron el sistema hemostático y fibrinolítico en potros neonatos con sospecha de septicemia (Barton et al., 1998). En este estudio, evaluaron 13 pruebas de la coagulación, en un total de 34 potros con sospecha de sepsis y otros 46 potros neonatos sanos de la misma edad.

En los potros con sospecha de sepsis, se observaron tiempos más largos de protrombina, tromboplastina parcial activada y recalcificación de sangre entera comparados con los potros sanos. El fibrinógeno y la PDF, el plasminógeno, la antiplasmina  $\alpha_2$ , el inhibidor de la actividad del plasminógeno, el factor de necrosis tumoral y las actividades de las interleuquina-6 estaban aumentadas en los potros sépticos. Por el contrario, la proteína C y la AT estaban significativamente disminuidas en los potros sépticos. La presencia de endotoxinas en potros sépticos estuvo asociada a tiempos más largos de coagulación (TP y TTPa) y a una disminución en plasminógeno y AT en estos animales. Veintitrés de los potros sépticos no sobrevivieron y en 11 de ellos se observaron evidencias de hemorragia en la histopatología. Además, en dos de ellos se observaron signos de trombosis.

Las conclusiones de esta investigación establecen que existían alteraciones clínicamente relevantes en los índices hemostáticos y fibrinolíticos de potros con septicemia, y estos cambios se correlacionaban con la presencia de endotoxemia. Los índices hemostáticos fueron útiles para la identificación de

potros con alto riesgo de sufrir coagulopatías, pero no para predecir si éstas iban a ser de tipo hemorrágico o tromboembólico (Barton et al., 1998).

Las concentraciones de dímeros-D de potros neonatos enfermos hospitalizados y de enfermos sépticos, fueron estudiadas con el objetivo de establecer si eran capaces o no de detectar sepsis o CID, o si tenían valor pronóstico en estos animales. Para ello, Armengou et al. (2008), evaluaron la concentración de dímeros-D en 40 potros neonatos sépticos, 41 potros hospitalizados pero sin septicemia y otros 22 potros neonatos sanos. En todos los potros hospitalizados tomaron muestras en la admisión al hospital, a las 24-48 horas después de la admisión y una vez le dieron el alta o fueron eutanasiados. Las pruebas realizadas a las muestras sanguíneas incluyeron: la medición de la concentración de los dímeros-D, los tiempos de coagulación (TP y TTPa), la AT y la FIB.

En la admisión y a la edad de 2-7 días, las concentraciones de dímeros-D eran más altas en los potros sépticos, cuando se compararon a las concentraciones en potros hospitalizados sin septicemia o a los sanos. La concentración de dímeros-D fue útil para diagnosticar septicemia, y o predecir la muerte de los animales en las muestras tomadas entre las 24 y 48 horas después de la admisión, y utilizando como valor de corte concentraciones >2000ng/mL. Se hizo un diagnóstico de CID en el 50% de los potros sépticos, aunque la concentración de los dímeros-D no estuvo significativamente asociada al diagnóstico de CID.

En las conclusiones de este estudio, el quipo de investigación establece que la concentración de dímeros-D está significativamente asociada al diagnóstico de sepsis (Armengou et al., 2008).

Recientemente, otro grupo de investigación estudió en profundidad los cambios que se producen en el sistema hemostático de potros neonatos con septicemia y/o shock séptico (Bentz et al., 2009). En su hipótesis, Bentz et al. (2009), establecieron que los potros neonatos críticamente enfermos presentarían anomalías en la coagulación, y que éstas estarían asociadas a la

gravedad de la enfermedad y al resultado final del paciente. En su estudio incluyeron 63 potros neonatos enfermos de menos de 72 horas de edad y que fueron hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos. A todos los potros les tomaron muestras de sangre a la llegada al hospital, y a las 24 y 48 horas posteriores para un PLT, TP, TTPa, AT, FIB y PDF. El diagnóstico de coagulopatía lo realizaron si al menos 3 de los parámetros medidos estaban fuera de los valores normales.

Los 63 potros del estudio fueron clasificados en 3 grupos diferentes según su estado de sepsis. 12 potros fueron clasificados como en shock séptico, 28 potros como sépticos y 23 potros como otros. AL menos uno de los parámetros hemostáticos medidos estaba fuera de los rangos de referencia en el 64% de los potros en shock séptico, en el 78% de los potros sépticos, y en el 51% de los otros potros. Se diagnosticó coagulopatía en el 58% de las muestras tomadas al grupo de shock séptico, en el 16% de las muestras de los potros sépticos y en el 5% de las muestras de los otros potros.

Clínicamente, en 8/12 (68%) de los potros del grupo se shock séptico se observó sangrado, al igual que en 11/28 (39%) de los potros sépticos y en 3/23 (13%) de los otros potros. Los potros en el grupo se shock séptico tenían 12.5 más posibilidades de presentar sangrado que los potros del grupo de otros. El tratamiento con plasma o fluidos pareció no tener una mayor influencia en los valores hemostáticos.

Como conclusión, los investigadores establecen que los potros críticamente enfermos comúnmente presentan coagulopatías, especialmente los potros sépticos y aquellos en shock séptico (Bentz et al., 2009).

# MATERIAL Y MÉTODOS



## 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el comité ejecutivo del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad del Estado de Ohio en Columbus (Ohio, Estados Unidos), y poseía toda la ética necesaria para el tratamiento humanitario de los animales usados en investigaciones clínicas.

Los caballos y potros incluidos en este estudio fueron pacientes del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad del Estado de Ohio (The Ohio State University) (Figura 6) entre los meses de Agosto de 2007 y Junio de 2009, o bien eran animales sanos y pertenecían a yeguas cercanas al hospital. Todos los propietarios dieron su consentimiento para participar en el estudio (Figura 7).

**Figura 6.-** Galbreath Equine Trauma, Intensive Care and Research Center. The Ohio State University, College of Veterinary Medicine, 601 Vernon L. Tharp Street, Columbus, OH, USA.



**Figura 7.-** Consentimiento informado que todos los propietarios firmaron antes de incluir a su animal en este estudio.

|  |                           |
|--|---------------------------|
| <b>The Ohio State University</b><br><b>Veterinary Teaching Hospital</b>  | <b>OWNER CONSENT FORM</b> |
| <b>Name of Study:</b> THROMBOELASTOGRAPHY IN HORSES  |                           |
| <b>Purpose and Brief Explanation of Study:</b> The Ohio State University Veterinary Teaching Hospital is evaluating bleeding disorders in horses with a novel diagnostic method: the Thromboelastograph (TEG®). In order to compare those results with normal physiologic ranges, a database of healthy horses and horses with colic must be developed. The study will involve the <b>collection of 6 ml of total blood in two 3.2% Sodium Citrated tubes</b> for TEG® hemostatic analysis. Once analyzed, the collective results from several dozens of horses are expected to add important knowledge and understanding to the disorders of coagulation and their prevention, early diagnosis/treatment.   |                           |
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. I, the undersigned, am the owner, or authorized agent for the owner, and agree to enter my animal into the above clinical study. The design and objectives of the study have been clearly explained to me.</li><li>2. I agree to allow the use of data collected as a result of my animal's inclusion in the study for publication in scientific journals and presentation at scientific meetings. I authorize the taking and use of photographs for teaching and publication purposes.</li><li>3. I have been informed of the most common adverse effects that might result from this procedure (Venous blood collection). Among those, the most serious adverse effects include: Hematoma at the venipuncture site.</li><li>4. I have been given an opportunity to ask any questions of the investigators relating to this study and my animal's condition. I certify that I have read and fully understand this authorization and consent to have my animal participate in this study.</li><li>5. I have been informed of the costs covered by the study and those which are my responsibility. <i>Please list those items for which the client will be financially responsible.</i> The study does not cover any other cost than processing the blood sample for TEG® test.</li></ol> |                           |
| Name of Pet:   |                           |
| _____  | _____                     |
| Signature of Owner/Agent   | Date                      |
| _____  | _____                     |
| Witness  | Date                      |
|  |                           |

## **4.1.- ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS**

### **4.1.1.- Caballos adultos sanos.**

Todos los caballos adultos sanos fueron sometidos a un examen físico completo, una analítica sanguínea, y un panel convencional de la coagulación (TTPa, TP, y FIB) antes de ser incluidos en el estudio. Requisito indispensable para confirmar la salud de los caballos fue que no presentaran ninguna anomalía en las pruebas a las que fueron sometidos. Este grupo fue utilizado para establecer rangos de referencia en nuestro laboratorio.

En todos estos animales, las muestras sanguíneas se tomaron siguiendo el mismo protocolo de investigación. Para ello, se realizó punción de la vena yugular derecha con una aguja de 20 G de tipo vacutainer (Vacutainer, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) adjunta a su adaptador correspondiente, una vez que la piel del animal había sido preparada asépticamente.

Para la recogida de la sangre, se utilizó primeramente un tubo de cristal de EDTA (EDTA Monoject™ Lavender Stopper, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA 02048 USA) de 2.7 mls y seguidamente se reemplazó por 2 tubos de citrato sódico (3.2 % buffered sodium citrate (0.105 M) Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ.), de 2.7 mls de capacidad para conseguir una dilución final de anticoagulante y sangre de 1:9. Todos los tubos fueron mezclados correctamente para una adecuada homogeneización.

### **4.1.2.- Caballos adultos con colitis y sospecha de coagulopatías.**

En este grupo se incluyeron caballos admitidos al hospital clínico veterinario que habían sido diagnosticados con colitis y que tenían alguno o ambos tiempos de coagulación (TTPa y/o TP) fuera de los rangos de referencia. En todos los caballos de este grupo la toma de muestras se realizó



siguiendo el mismo protocolo de investigación que fue utilizado en los caballos adultos sanos.

### **4.1.3.- Potros neonatos sanos.**

Todos los potros neonatos sanos incluidos en este estudio eran menores de 8 días de edad. La salud de los potritos fue establecida en base a un examen físico normal, una analítica sanguínea completa dentro de los valores normales, una concentración sérica de inmunoglobulina G adecuada ( $>800\text{mg/dL}$ ) (Figura 8), una puntuación de sepsis  $\leq 8$  (Figura 9) (Brewer and Koterba, 1988), y un panel convencional de la coagulación (TTPa, TP, FIB, y AT) dentro del rango de referencia. Este grupo fue utilizado para establecer rangos de referencia en nuestro laboratorio.

Las muestras de sangre fueron tomadas mediante punción de la vena yugular derecha con una aguja de 20 G de tipo vacutainer (Vacutainer, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) adjunta a su adaptador correspondiente, una vez que la piel del animal había sido preparada asépticamente. Posteriormente, se colocó un tubo de cristal de EDTA (EDTA Monoject<sup>TM</sup> Lavender Stopper, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA 02048 USA) de 2.7 mls y seguidamente se reemplazó por 2 tubos de citrato sódico (3.2 % buffered sodium citrate (0.105 M) Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ.), de 4.5 mls de capacidad para conseguir una dilución final de anticoagulante y sangre de 1:9. Todos los tubos fueron mezclados correctamente para una adecuada homogeneización.

### **4.1.4.- Potros neonatos enfermos.**

Los potros neonatos enfermos incluidos en este estudio fueron admitidos a nuestro hospital clínico veterinario entre Enero del 2008 y Mayo del 2009. Todos los animales eran  $\leq 8$  días de edad y fueron clasificados en dos grupos:

- Enfermos No Sépticos (NS), y
- Enfermos Sépticos (S).

El grupo NS estaba constituido por potros enfermos (con impactaciones por meconio, encefalopatía isquémica hipóxica y problemas ortopédicos) pero que no tuvieran ningún foco de infección o fueran diagnosticados con septicemia. Uno de los requisitos para ser incluido en este grupo fue el tener cultivos sanguíneos negativos y/o una puntuación de sepsis  $\leq 8$  (Figura 9) (Brewer and Koterba, 1988).

El grupo S estaba constituido por potros enfermos los cuales tenían un cultivo sanguíneo positivo y/o una puntuación de sepsis  $\geq 12$  (Figura 9) (Brewer and Koterba, 1988) y un foco séptico (ej. onfaloflebitis).

De la historia clínica de los potros neonatos enfermos se recogieron los siguientes datos: historia completa de todos los potros, edad, sexo, raza, razón por la que fue hospitalizado, y el examen físico completo (incluyendo la presencia de un foco séptico, como neumonía, enteritis, uveítis, onfaloflebitis, o artritis) para la clasificación de los animales en los diferentes grupos. Además, se recogió la información clinicopatológica referente a la puntuación de sepsis (Figura 9) (Brewer and Koterba, 1988), hematocrito (Hto), proteínas totales (PT), plaquetas (PLT), conteo de células blancas, inmunoglobulina G (IgG) (Figura 10; Hitachi 911 system, Boehringer Mannheim Corp, Indianapolis, IN), y los resultados de cultivos bacterianos (aeróbicos y anaeróbicos) (Figura 11; BBL Septi-Chek blood culture system, Becton; Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Además hay que añadir que se realizaron cultivos sanguíneos de forma sistemática a todos los potros que se hospitalizaron en nuestro hospital.

Todos los potros que habían recibido fluidos, antibióticos, anticoagulantes, o productos del plasma antes de la admisión en nuestro hospital o antes de la toma de muestras fueron automáticamente excluidos del estudio.

**Figura 8.-** Test rápido para la medición de IgG en potros neonatos. (SNAP Foal IgG Test Kit, IDEXX Laboratories Inc, Westbrook, ME).



**Figura 9.-** Puntuación de sepsis para potros neonatos utilizada en este estudio (Brewer and Koterba, 1988).

## Foal Sepsis Score Sheet

**The Ohio State University Veterinary Teaching Hospital**

Date \_\_\_\_\_

Total Score: \_\_\_\_\_

Check one:

\_\_\_\_\_ At Admission?

\_\_\_\_\_ Day subsequent to admission?

Indicate Day # \_\_\_\_\_

|  | Number of points to assign: |                     |          |        |                    |           |
|--|-----------------------------|---------------------|----------|--------|--------------------|-----------|
| Foal sepsis score:   | 4                           | 3                   | 2        | 1      | 0                  | this case |
| <b>I. CBC</b>  |                             |                     |          |        |                    |           |
| record<br>Exact #  |                             |                     |          |        |                    |           |
| 1. Neutrophil count<br>(NOT TOTAL WBC)   | <2.0 x 10 <sup>9</sup> /l   | 2.0-4.0<br>or >12.0 | 8.0-12.0 | Normal |                    |           |
| 2. Band neutrophil count   | >0.2 x 10 <sup>9</sup> /l   | 0.05-0.20           |          | <0.05  |                    |           |
| 3. Doehle bodies<br>Toxic, granulation,<br>Or vacuolization<br>In neutrophills   | marked                      | moderate            | slight   |        | none               |           |
| 4. Fibrinogen (mg/dl)  |                             | >600                | 410-600  | <400   |                    |           |
| <b>II. Other Laboratory Data</b>   |                             |                     |          |        |                    |           |
| 1. Hypoglycemia (mg/dl)  |                             | <49                 | 49-79    | >79    |                    |           |
| 2. IgG (mg/dl)   | <200                        | 200-400             | 400-800  | >800   |                    |           |
| 3. Aterial oxygen  | <40 Torr                    | 40-50               | 51-70    | >70    |                    |           |
| 4. Metabolic acidosis  |                             |                     | Yes      | No     |                    |           |
| <b>III. Clinic Examination</b>   |                             |                     |          |        |                    |           |
| 1. Petechiation or<br>Scleral injection<br>No secondary to eye<br>Disease or trauma                                    |                             | Marked              | Moderate | Mild   | None               |           |
| 2. Fever (°F)  |                             |                     | >102°F   | <100°F | Normal             |           |
| 3. Hypotonia, coma<br>depression, convulsions  |                             |                     | Marked   | Mild   | Normal             |           |
| 4. Anterior uveitis,<br>Diarrhea, respiratory distress<br>Swollen joints, open wounds                                  |                             | Yes                 |          |        | No                 |           |
| <b>IV. Historical data</b>   |                             |                     |          |        |                    |           |
| 1. Placentitis, vulvar<br>Discharge prior to delivery,<br>Dystocia, long transport of mare,<br>Mare sick, foal induced |                             | Yes                 |          |        | No                 |           |
| 2. Prematurity   | <300 days                   | 300-310             | 311-330  | >330   |                    |           |
|  |                             |                     |          |        | Total Points _____ |           |

1. If a foal older than 12 h, compute the score using the IgG value you get back from the lab.  
 2. If it less than 12 h, give it a +2 for IgG if it has a history of nursing what appeared to be a good colostrum. Give the foal a +4 if it has not nursed or if in doubt.  
 3. A score of 12 or higher correctly predicts sepsis 93% of the time. A score of 11 or less predicts non-sepsis correctly 88% of the time.

FOAL SEPSIS SCORE SHEET

**Figura 10.-** Analizador de inmunoglobulina G (Hitachi 911 system, Boehringer Mannheim Corp, Indianapolis, IN).



**Figura 11.-** BBL Septi-Chek sistema de cultivos sanguíneos, Becton; Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA.



En el grupo de potros enfermos, la toma de muestras sanguíneas se realizó de forma aséptica a través de un catéter intravenoso (Figura 12), antes de la administración de fluidos o algún tipo de medicación, y desechando los primeros 10 mls. La sangre se colocó en un tubo de cristal de EDTA (EDTA Monoject™ Lavender Stopper, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA 02048 USA) de 2.7 mls y en 2 tubos de citrato sódico (3.2 % buffered sodium citrate (0.105 M) Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ.), de 4.5 mls de capacidad para conseguir una dilución final de anticoagulante y sangre de 1:9. Además, se obtuvieron 20 mls de sangre para la realización de cultivos sanguíneos.

**Figura 12.-** Momento de extracción de la muestra sanguínea una vez el catéter había sido colocado asépticamente en la vena yugular derecha de un potro enfermo y antes de la administración de medicamentos o fluidos.



## 4.2.- PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Todas las muestras fueron obtenidas, manipuladas y procesadas por el doctorando. El tubo de EDTA fue enviado al laboratorio para la obtención de una analítica sanguínea completa. Uno de los tubos citratados (Figura 13), fue almacenado durante 30 minutos a temperatura ambiente en una gradilla para el posterior análisis tromboelastográfico. El segundo tubo de citrato fue centrifugado (1380 x G 12 min) inmediatamente a temperatura ambiente para la obtención de plasma. Una vez centrifugada la muestra y separado el plasma de las células sanguíneas, se pasó a la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figura 14) y almacenamiento de dicho plasma, a la espera del análisis del panel hemostático.

Al final del estudio, se realizó un panel hemostático completo [incluyendo TP, TTPa, y FIB y AT (solamente en los potros)] a todas las muestras de plasma, utilizando un analizador de la coagulación (Figura 15; ACL® 7000 Coagulation Analyzer; Beckman Coulter, Inc, IL, USA).

**Figura 13.-** 4.5 mL, 3.2 % buffered sodium citrate (0.105 M) Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ.



**Figura 14.-** Congelador de -80 °C.



**Figura 15.-** ACL® 7000 Analizador de la coagulación; Beckman Coulter, Inc, IL, USA.



El hemograma se realizó dentro de los 60 minutos posteriores a la toma de muestras en un analizador automático (Figura 16; Cell-Dyn 3500R automated hematology analyzer; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), seguido de un conteo manual de las diferentes células blancas (Leucocitos).



**Figura 16.-** Cell-Dyn 3500R Analizador hematológico automático; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA.



#### 4.3.- ANALISIS TROMBOELASTOGRÁFICO

Todas las muestras fueron analizadas por el doctorando, utilizando el mismo tromboelastógrafo (Figura 17), y siguiendo las instrucciones del fabricante (TEG® 5000 User's Manual Haemoscope (1995-2005)).

**Figura 17.-** TEG® 5000 Tromboelastógrafo; Analizador de la coagulación; software versión 4.2.2 (Haemoscope Corporation, Nilus, IL, USA).

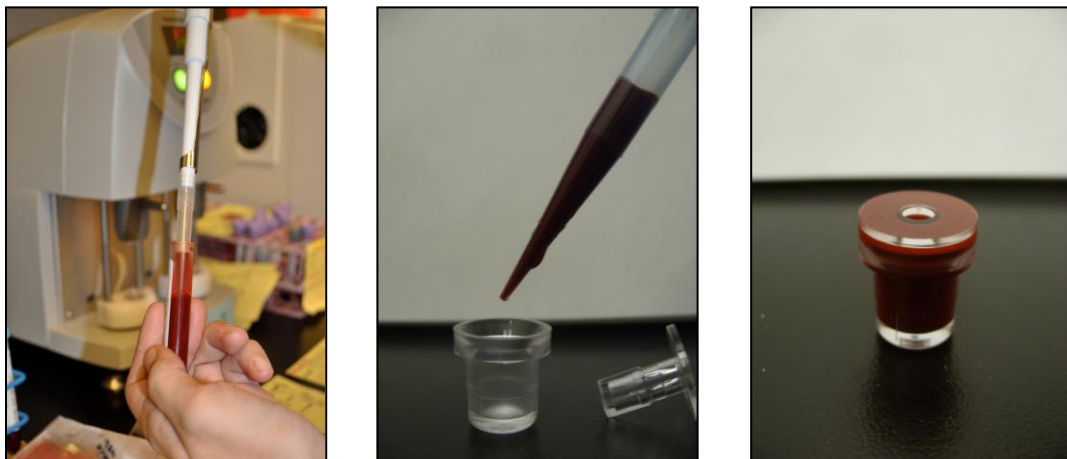


Para el análisis tromboelastográfico, se añadieron 20 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de 0.2 M  $\text{CaCl}_2$  (Figura 18) a una de las tacitas de TEG que había sido previamente precalentada a  $37^\circ\text{C}$ , y había sido colocada en uno de los canales del tromboelastógrafo (Figura 19). Del tubo de sangre citratada que había sido reposado a temperatura ambiente, se tomaron 340  $\mu\text{L}$  y se añadieron a la misma tacita de reacción. En la realización de la metodología, se tomó mucha precaución al pipetear y depositar la sangre en la tacita, para así evitar cualquier posible activación de la coagulación o la formación de burbujas de aire (Figura 19).

**Figura 18.-** Cloruro cálcico, 0.2 M, Haemoscope Corporation, Niles, IL, USA.



**Figura 19.** Tazas de reacción de la TEG (Haemoscope Corporation, Niles, IL, USA).





Las gráficas y resultados se obtuvieron después de 120 minutos de análisis, a una temperatura de 37° C. Los parámetros tromboelastográficos medidos y que se consideraron a estudio, fueron los siguientes: Tiempo-R (R), Tiempo-K (K), ángulo ( $\alpha$ ), amplitud máxima (MA), valor G, y lisis a los 60 minutos (LY60) (Figuras 20, 21 y 22).

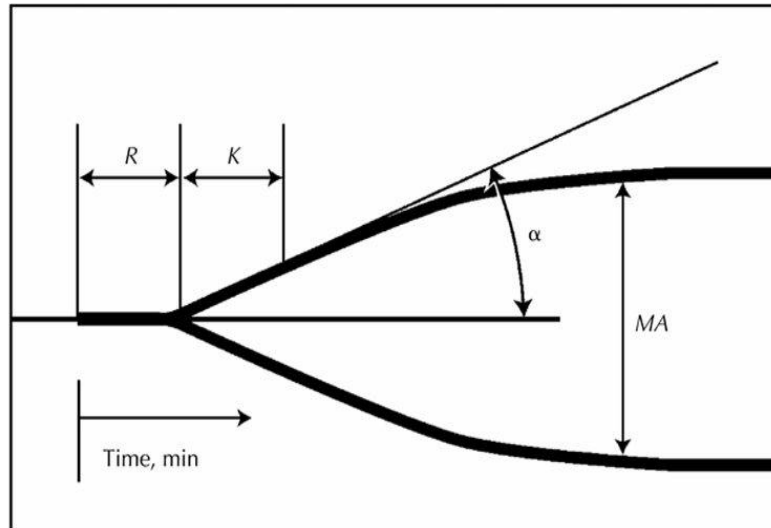
### **4.3.1.- Caballos adultos.**

Se realizó un único análisis por muestra, excepto en 10 caballos adultos sanos en los que las muestras fueron analizadas por duplicado (para evaluar la variabilidad dentro de la misma muestra), utilizando ambos canales del tromboelastógrafo simultáneamente.

### **4.3.2.- Potros neonatos.**

En todos los potros se realizó un único análisis por potro, excepto en diez de los potros sanos, en los cuales las muestras fueron analizadas por duplicado usando ambos canales del tromboelastógrafo simultáneamente, con el objetivo de evaluar la precisión del tromboelastógrafo. Además, en 5 de estos potros sanos, se tomaron muestras y se realizó un análisis tromboelastográfico a las 12 h., 24 h., y 7 días de vida del potro, para evaluar los cambios dentro de los primeros días de vida.

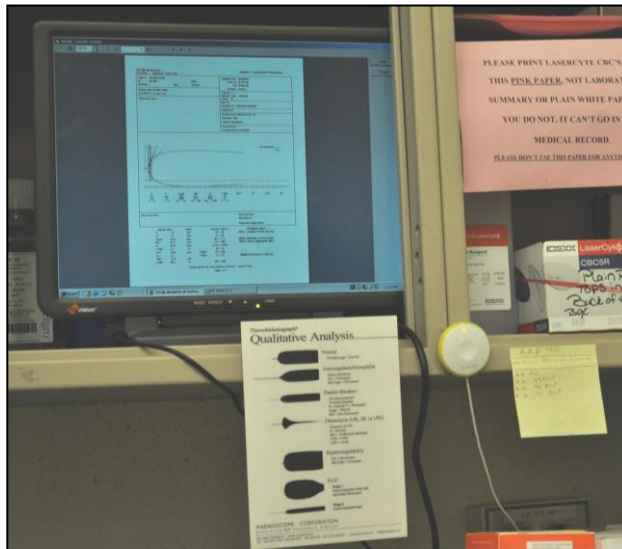
**Figura 20.** Gráfica típica de la tromboelastografía y sus valores más relevantes: Tiempo R (R), Tiempo K (K), ángulo ( $\alpha$ ), y máxima amplitud (MA).



**Figura 21.-** Software del tromboelastógrafo en funcionamiento. En el lateral izquierdo se pueden observar las gráficas obtenidas, y en el lado derecho el valor numérico de los diferentes parámetros tromboelastográficos.



**Figura 22.-** Resultado final de una prueba de tromboelastografía en un caballo adulto clínicamente sano.



## 4.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 4.4.1.- Caballos adultos.

La distribución de todos los datos fue evaluada con el método de Agostino. Los coeficientes de variación (CV) fueron utilizados para calcular la variabilidad entre individuos y dentro de la misma muestra. La media y dos veces la desviación estándar fue el método utilizado para calcular los rangos de referencia para cada parámetro de la TEG.

Los coeficientes de correlación se calcularon utilizando datos de todos los individuos. La fiabilidad de nuestro estudio para detectar una correlación ( $r$ ) de 0,4 o mayor fue mayor del 80%. Los parámetros de la TEG de ambos grupos fueron comparados usando la T de Student y el test de Mann-Whitney para los datos con distribución Gausiana y no Gausiana, respectivamente.

Todas las diferencias estadísticas se establecieron para valores de  $p < 0.5$ . El programa de ordenador Prism Statistical Software package fue el empleado para el cálculo de todas las estadísticas.

#### **4.4.2.- Potros neonatos.**

Todos los resultados fueron sometidos a análisis estadístico (Prism version 4.0, GraphPad software Inc, San Diego,CA), y la distribución de los datos fue evaluada usando el test de D'Agostino y Pearson omnibus test. Los rangos de referencia para los potros neonatos se calcularon usando los percentiles 2.5 y 97.5. Las variaciones entre individuos, dentro de la misma muestra, entre el mismo individuo (a las 12 horas, 24 horas, y 7 días de vida) fueron analizadas dentro del grupo de potros sanos usando los coeficientes de variación (CV). La variación entre individuos fue calculada solamente considerando la primera muestra tomada de cada individuo sano.

Los resultados de la TEG de los 5 potros que se evaluaron a las 12 h, 24h, y 7 días, fueron utilizados para monitorizar los cambios producidos en la coagulación dentro de los primeros 7 días de vida.

Cuando los datos presentaban una distribución Gaussiana, los tres grupos (H, NS, y S) fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Bonferroni (post-test) cuando se encontraron diferencias estadísticas. Cuando los datos no presentaban una distribución Gaussiana, los grupos fueron comparados mediante el test de Kruskal-Wallis, seguido por el test de Dunnet (post-test) cuando se encontraron diferencias estadísticas.

El estudio de las correlaciones entre las variables de la TEG y los valores hematológicos y hemostáticos convencionales, se llevaron a cabo mediante el test de Pearson (cuando los datos seguían una distribución Gaussiana) y mediante el test no paramétrico de Spearman (cuando los datos no seguían la distribución Gaussiana). También, se realizó un estudio de regresión lineal de las variables cuando se encontró una correlación estadísticamente significativa. En este estudio, todas las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ .



# RESULTADOS





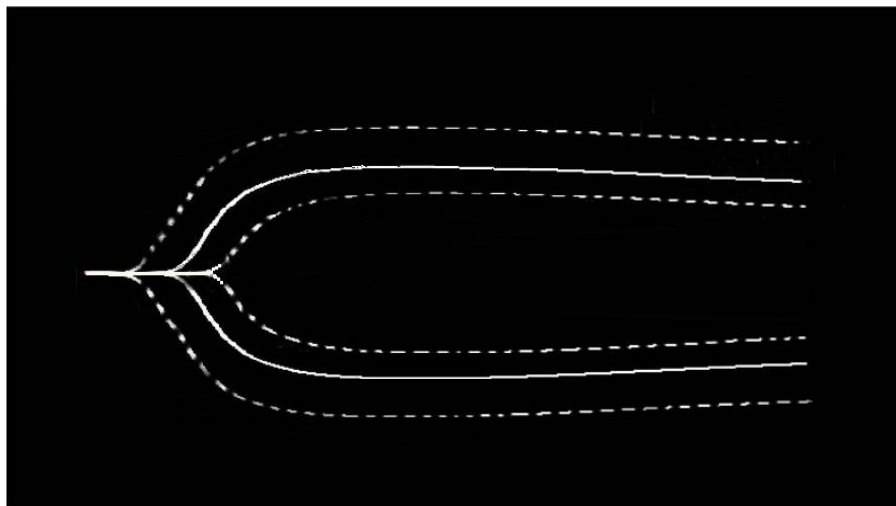
## 5.- RESULTADOS

### 5.1.- CABALLOS ADULTOS SANOS

Los équidos adultos sanos incluidos en el estudio fueron 45 animales pertenecientes a las siguientes razas: Cuarto de Milla (n=15), Pura Sangre Inglés (n=8), Troton (n=11), Sangre Caliente (n=6), Árabe (n=2), Poni Welsh (n=2), y poni Irish Cob (n=1). En este grupo había 2 sementales, 24 machos castrados y 19 yeguas sexualmente intactas. La edad media  $\pm$  DS de los animales fue de  $12 \pm 5$  años, y los pesos medios  $\pm$  DS eran de  $480 \pm 145$  kg.

Los resultados de los valores de la tromboelastografía, hematología y panel hemostático de los 45 caballos, expresados como media  $\pm$  desviación estándar están reflejados en la Tabla 3. Los rangos de referencia calculados en base a la media  $\pm$  dos veces la desviación estándar están presentados en la Tabla 4. Una gráfica representativa de TEG en un caballo adulto sano y una aproximación a los rangos de referencia, está mostrada en la Figura 23. La variabilidad entre individuos y la variabilidad dentro de la misma muestra, expresadas como coeficientes de variación, están presentadas en la Tabla 5.

**Figura 23.-** Gráfica de la tromboelastografía de un caballo sano (línea continua). Las líneas discontinuas muestran los rangos de referencia de nuestro laboratorio en caballos adultos sanos.



## Resultados

**Tabla 3.** Valores tromboelastográficos (TEG) en caballos adultos sanos y con trastornos gastrointestinales y coagulopatías sospechadas. Los resultados están presentados como media (desviación estándar) y rango.

| Parámetros               | Caballos adultos sanos<br>media ± DS n=45 | Caballos con colitis<br>media ± DS (Rango)<br>n=12 | P      |
|--------------------------|---|--|--------|
| R (min)                  | 10.4 ± 3.1                                | 22.0 ± 12.8 (10.8-54.2)                            | <0.001 |
| K (min)                  | 3.5 ± 1.2                                 | 8.3 ± 6.9 (3.4-26.5)                               | <0.001 |
| α (grados)               | 46.3 ± 11.0                               | 26.6 ± 13.6 (3.1-43.6)                             | <0.001 |
| MA (mm)                  | 55.6 ± 5.1                                | 44.0 ± 16.4 (11.9-65.5)                            | 0.001  |
| G (dyn/cm <sup>2</sup> ) | 6429 ± 1341                               | 5151 ± 2523 (1633-9480)                            | 0.02   |
| LY60 (%)                 | 5.1 ± 2.4                                 | 6.1 ± 3.1 (0.0-9.2)                                |        |
| Hto (%)                  | 37.7 ± 3.2                                | 51.2 ± 5.6   | <0.001 |
| PT (g/dL)                | 7.1 ± 0.3                                 | 7.5 ± 1.1  | >0.05  |
| PLT (K/μL)               | 170.0 ± 31.5                              | 326.0 ± 199.8                                      | <0.001 |
| TP (sec)                 | 12.1 ± 0.8                                | 13.5 ± 1.6   | 0.002  |
| TTPa (sec)               | 52.5 ± 4.5                                | 72.3 ± 19.3  | <0.001 |
| Fib (mg/dL)              | 299.4 ± 55.1                              | 413.8 ± 183.9                                      | 0.01   |

**Tabla 4.** Rango de referencia para los parámetros de la TEG en caballos adultos sanos calculados en base a la media ± dos veces la desviación estándar.

| TEG                 | Tiempo R (min) | Tiempo K (min) | Ángulo (α) | MA (mm)   | Valor G (dyn/cm <sup>2</sup> ) | LY60 (%) |
|---------------------|----------------|----------------|------------|-----------|--------------------------------|----------|
| Rango de referencia | 5-16.6         | 1.3-6.1        | 23-65.8    | 44.9-64.1 | 3773-8489                      | 0.3-9.9  |

**Tabla 5.** Coeficientes de variación (CV) entre individuos y dentro de la misma muestra para los valores tromboelastográficos (TEG) en caballos adultos sanos expresados en porcentajes (%).

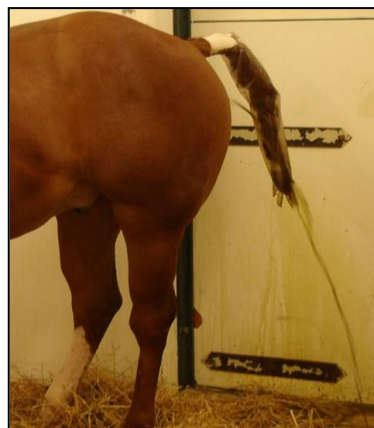
| TEG<br>CV (%)                         | Tiempo R<br>(min) | Tiempo<br>K (min) | Ángulo<br>( $\alpha$ ) | MA<br>(mm) | Valor G<br>(dyn/cm <sup>2</sup> ) | LY60<br>(%) |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|------------|-----------------------------------|-------------|
| Entre<br>individuos<br>n=45           | 30.7 %            | 35.3 %            | 23.8 %                 | 9.3 %      | 20.8 %                            | 47.7 %      |
| Dentro de la<br>misma<br>muestra n=10 | 4.7 %             | 4.8 %             | 4.4 %                  | 1.4 %      | 3.4 %                             | 13.1 %      |

Cuando se compararon los parámetros de la TEG y del panel hemostático entre los caballos castrados y las yeguas, no se encontraron diferencias estadísticas. La edad tampoco fue estadísticamente diferente entre caballos castrados y yeguas ( $p=0.48$ ) y no existía correlación con ninguno de los parámetros de la TEG ( $r<0.2$ ).

## 5.2.- CABALLOS ADULTOS CON COLITIS Y SOSPECHA DE COAGULOPATÍAS

Las razas incluidas en este grupo de caballos con colitis (Figura 24) fueron las siguientes: Trotón (6), Pura Sangre Inglés (3), y Cuarto de Milla (3). De estos équidos utilizados, 8 eran caballos castrados y 4 eran yeguas, con una edad media de  $8 \pm 1.8$  años, y un peso medio de  $530 \pm 89$  kg.

**Figura 24.** Uno de los caballos con colitis incluido en el estudio.

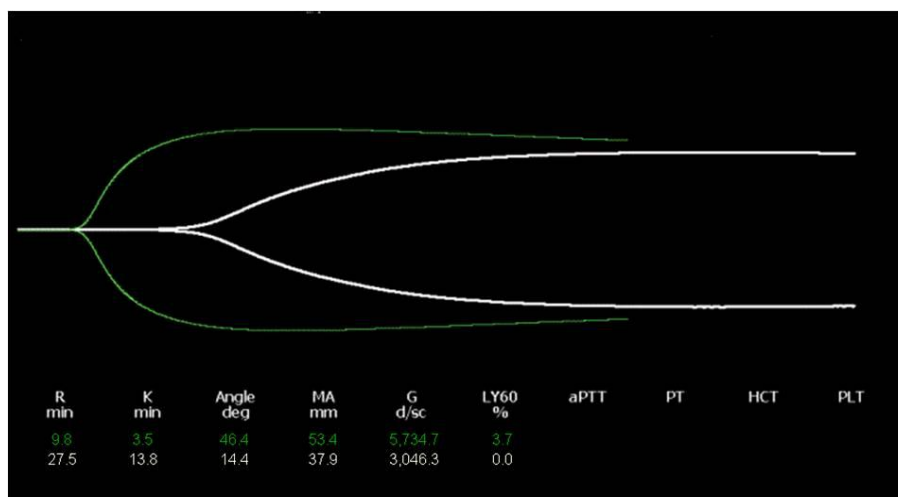


## Resultados

Los resultados de la TEG, valores hematológicos (PLT, Hto y PT) y el panel hemostático, expresados como media  $\pm$  DT, están representados en la Tabla 3. El rango, expresado como mínimo y máximo, está también presentado en la Tabla 3 para los valores de la tromboelastografía. Una gráfica de TEG de uno de los caballos con colitis está mostrada en la Figura 25 (traza blanca). El conteaje de células blancas en estos caballos, estuvo entre  $2.4$  y  $13.5 \times 10^9$  células/L (media  $\pm$  DT,  $7.6 \pm 3.5 \times 10^9$  células/L).

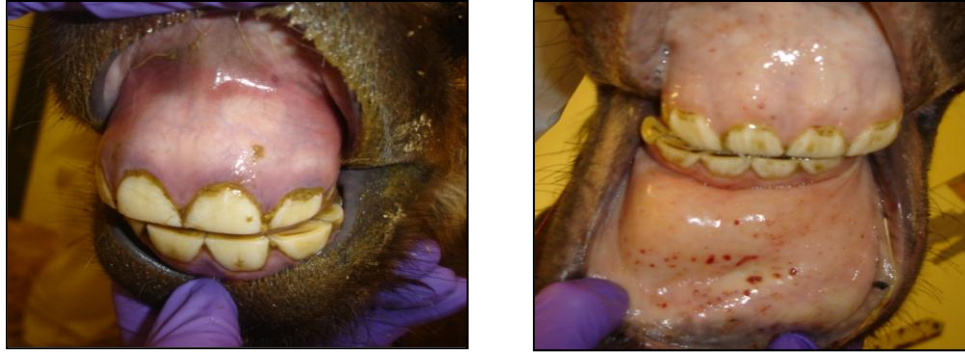
Tres de los caballos tenían leucopenia ( $<4.7 \times 10^9$  cells/L), sin embargo, uno de ellos tenía leucocitosis ( $>10.6 \times 10^9$  cells/L). La concentración de lactato estaba disponible en la historia clínica para nueve de los caballos y los valores encontrados iban desde  $1.2$  a  $9.1$  mmol/L. El porcentaje de supervivencia de los caballos con colitis fue del 41% (5/12), y solamente uno tuvo como complicación, sangrado (epistaxis y petequias) (Figura 26). En la Figura 27, se puede observar el seguimiento tromboelastográfico realizado al caballo que presentaba hemorragias desde su llegada al hospital hasta la eutanasia a intervalos de 6 horas. Este seguimiento se realizó por interés clínico y fuera de este estudio.

**Figura 25.** Tromboelastogramas superpuestos de un caballo adulto sano (traza verde) y un caballo con colitis (traza blanca) y tiempos de coagulación prolongados (traza blanca). Los valores de la tromboelastografía para ambos animales están representados en la gráfica.

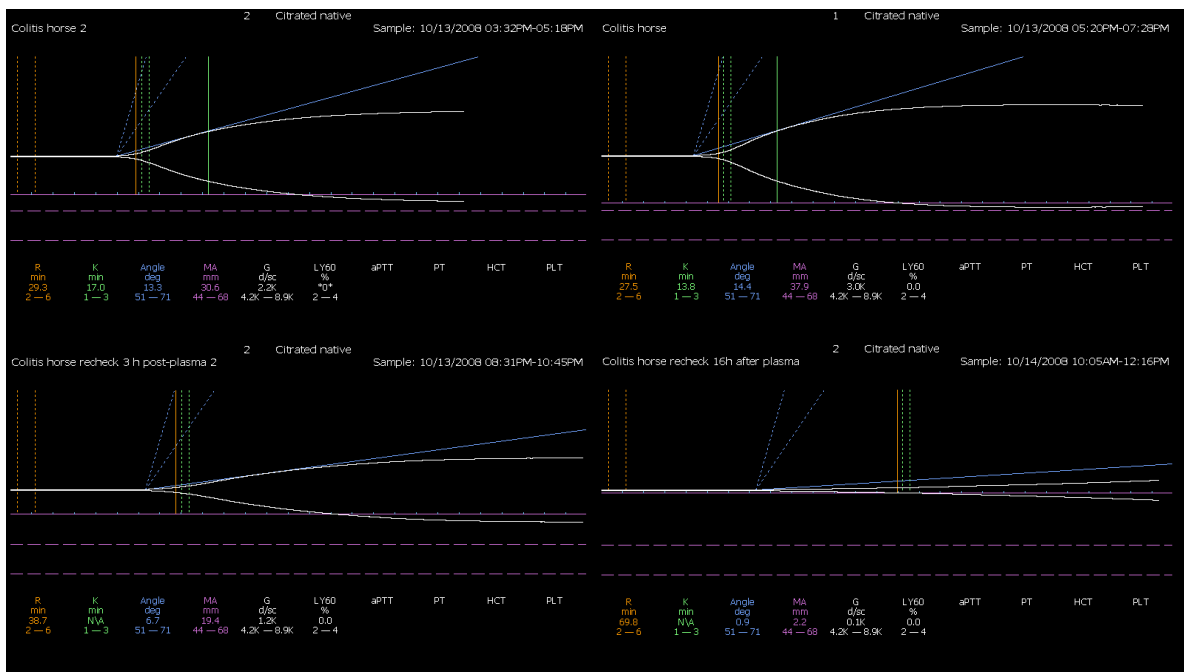


## Resultados

**Figura 26.** En estas imágenes podemos observar las mucosas de 2 de los caballos con colitis incluidos en el estudio. La foto de la izquierda muestra un halo endotóxico muy marcado. La foto de la derecha muestra petequias en el labio inferior.



**Figura 27.-** Gráficas del seguimiento tromboelastográfico de un caballo con colitis severa desde su llegada al hospital hasta que tuvo que ser eutanasiado.



### Comparaciones y Correlaciones

Los resultados hematológicos, panel hemostático y parámetros de la TEG de los caballos con colitis fueron estadísticamente diferentes de los caballos adultos sanos (ver Tabla 3). Los caballos con colitis tuvieron tiempos R y K más largos, ángulos medios más estrechos, MA reducidas y valores G medios más pequeños que los caballos sanos. Los valores medios de plaquetas, fibrinógeno y hematocrito fueron estadísticamente diferentes, teniendo valores más altos los caballos con colitis. Una correlación positiva se detectó entre el TTPa y el tiempo R ( $r=0.55$ ), y entre el TTPa y el tiempo K ( $r=0.43$ ). No se observaron correlaciones al comparar PLT, Hto, TP, Fib y los valores de la TEG entre caballos sanos y caballos con colitis.

### 5.3.- POTROS NEONATOS SANOS, ENFERMOS NO SÉPTICOS Y SÉPTICOS

En este estudio se incluyeron 50 potros neonatos: 18 fueron categorizados como sanos (Grupo H) (Figura 28), 15 como enfermos no sépticos (Grupo NS) (Figura 29), y 17 como sépticos (Grupo S) (Figura 29). Entre ellos había 28 (66%) potros machos y 22 (44%) potras. La edad media  $\pm$  DT de los potros fue  $2.2 \pm 1.6$  días y el peso medio fue  $48.9 \pm 8.4$  kg.

Al comparar la edad y los pesos entre los diferentes grupos, se encontraron diferencias estadísticas en la edad entre el grupo H [edad media  $1.72 \pm 1.22$  días] y el grupo S [edad media  $3.16 \pm 1.88$  días]. Los potros incluidos en el estudio pertenecían a las siguientes razas: Cuarto de Milla ( $n=23$ ), Trotones ( $n=10$ ), Pura Sangre Inglés ( $n=6$ ), Cruzados ( $n=4$ ), Sangre Caliente ( $n=3$ ), Percheron ( $n=1$ ), Árabe ( $n=1$ ), Tennessee Walker ( $n=1$ ), y Haflinger ( $n=1$ ).

**Figura 28.** Potro neonato sano de dos días de vida y cuya coagulación fue evaluada mediante TEG.



Las patologías primarias diagnosticadas en el grupo NS incluyeron: cólico (2), ruptura de la vejiga urinaria (2), disfagia (2), deformidades flexurales (2), encefalopatía isquémica hipóxica (2), uraco persistente (2), impactación por meconio (1), malformación del pene (1), e isoeritrolisis neonatal (1).

En el grupo de los potros sépticos, 14 de los 17 tuvieron un cultivo sanguíneo positivo, en donde fueron aislados los siguientes organismos: *Escherichia coli* (n=7), *Actinobacillus spp.* (n=4), *Enterococcus spp.* (n=2), *Staphylococcus spp.* (n=2), *Clostridium perfringens* (n=1), y *Proteus spp.* (n=1).

La presencia de al menos uno de los siguientes focos de infección fue encontrada en 15 de los potros sépticos: artritis séptica (n=7), enteritis (n=5), neumonía (n=4), onfalitis (n=2), paniculitis (n=2), y fisitis séptica (n=1).

Tres de los potros en el grupo S y dos del grupo NS fueron eutanasiados debido a un pobre pronóstico. La puntuación de sepsis para el grupo H varió entre 0 y 3 puntos (mediana, 1 punto); en el grupo NS varió entre 0 y 8 (mediana, 6 puntos), y en el grupo S varió entre 12 y 21 puntos (mediana



14 puntos). No se observaron signos de sangrado o petequias en ninguno de los potros al tiempo de la toma de muestras.

**Figura 29.-** Potros enfermos que fueron admitidos al Hospital Clínico Veterinario de la Ohio State University en la primavera de 2008 y los cuales fueron incluidos en este estudio. El potro de la izquierda presentaba solamente deformidades angulares y fue incluido en el grupo NS. EL potro de la derecha presentaba septicemia (*Escherichia coli*).



Los resultados del análisis tromboelastográfico y los rangos de referencia de la TEG de los 18 potros sanos, están presentados en las Tablas 6 y 7, respectivamente. Las variaciones entre individuos, dentro de la misma muestra, y en el mismo potro a las 12 horas, 24 horas, y 7 días de vida, en los potros clínicamente sanos están expresadas como CV (%) en la Tabla 8. Los cambios de los parámetros de la tromboelastografía a las 12 h, 24 h, y a los 7 días de vida en los potros neonatos sanos están representados en la Figura 30.

## Resultados

**Tabla 6.** Valores tromboelastográficos (TEG) en potros neonatos sanos, enfermos no sépticos, y sépticos. Los resultados están presentados como media (desviación típica) y rango.

| Parámetros de la TEG           | Potros Sanos (H) |               | Enfermos no sépticos (NS)   |               | Enfermos sépticos (S)        |                |
|--------------------------------|------------------|---------------|-----------------------------|---------------|------------------------------|----------------|
|                                | Media (DT)       | Rango         | Media (DT)                  | Rango         | Media (DT)                   | Rango          |
| Tiempo R (min)                 | 11.82 (5.35)     | 4.90 – 25.20  | 13.83 (6.56)                | 3.00 – 24.40  | 12.61 (7.19)                 | 2.70 – 28.80   |
| Tiempo K (min)                 | 3.06 (1.34)      | 1.40 – 6.00   | 4.11 (1.34)                 | 1.40 – 6.00   | 3.07 (1.62)                  | 1.10 – 6.20    |
| Ángulo (grados)                | 51.19 (12.66)    | 21.00 – 66.40 | 42.56 (12.54) <sup>  </sup> | 19.00 – 68.40 | 55.68 (12.32) <sup>§</sup>   | 36.90 – 76.40  |
| MA (mm)                        | 55.06 (6.67)     | 42.00 – 65.50 | 54.50 (8.28) <sup>  </sup>  | 35.50 – 64.00 | 65.48 (7.55)* <sup>§</sup>   | 48.50 – 76.20  |
| Valor G (dyn/cm <sup>2</sup> ) | 6,361 (1,700)    | 3,618 – 9,499 | 6,309 (1,918) <sup>  </sup> | 2,754 – 8,886 | 10,139 (3,276)* <sup>§</sup> | 4,709 – 15,970 |
| LY60 (%)                       | 2.71 (2.59)      | -1.20 – 6.80  | 1.14 (1.51) <sup>  </sup>   | -0.10 – 4.20  | 3.36 (2.03) <sup>§</sup>     | 1.10 – 7.60    |

\*Significativamente diferente del grupo de potros sanos (H).

<sup>§</sup>Significativamente diferente del grupo de potros enfermos no sépticos (NS).

<sup>||</sup> Significativamente diferente del grupo de potros sépticos (S).

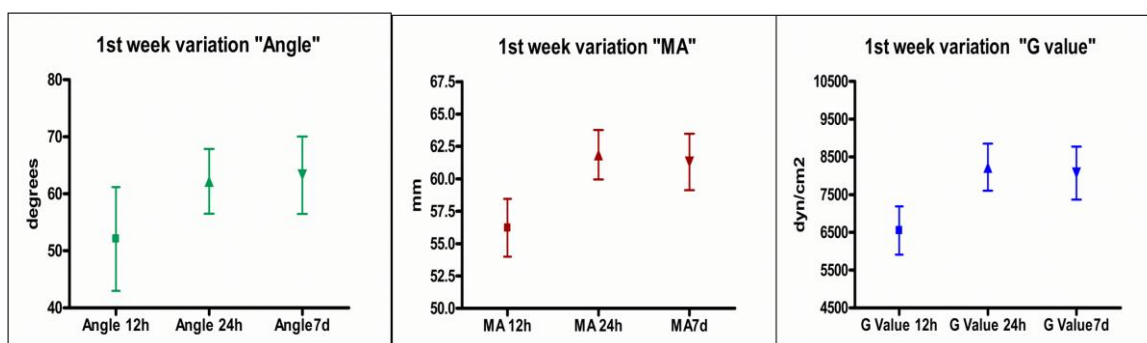
**Tabla 7.** Rango de referencia para los parámetros de la TEG en potros neonatos sanos, calculados mediante los percentiles 2.5 y 97.5.

| TEG                 | Tiempo R (min) | Tiempo K (min) | Ángulo ( $\alpha$ ) | MA (mm)     | Valor G (dyn/cm <sup>2</sup> ) | LY60 (%) |
|---------------------|----------------|----------------|---------------------|-------------|--------------------------------|----------|
| Rango de referencia | 5.07-22.26     | 1.57-8.1       | 26.27-66.18         | 42.68–65.03 | 9300.69–3724.99                | 0.0-6.64 |

**Tabla 8.** Variaciones entre individuos, dentro de la misma muestra y en el mismo individuo a las 12 horas, 24 horas, y 7 días, de los 18 potros neonatos clínicamente sanos. Los resultados están expresados como coeficientes de variación (%).

| TEG CV (%)                             | Tiempo R (min) | Tiempo K (min) | Ángulo (grados) | MA (mm) | G (dyn/cm <sup>2</sup> ) | LY60 (%) |
|--|----------------|----------------|-----------------|---------|--------------------------|----------|
| Entre individuos                       | 45.2           | 58.7           | 24.7            | 12.1    | 26.7                     | 95.5     |
| Dentro de la misma muestra             | 3.5            | 5.3            | 1.5             | 0.3     | 1.6                      | 5.4      |
| Mismo individuo (a las 12h, 24h, y 7d) | 43.1           | 28.7           | 11.9            | 6.1     | 14.7                     | 69.5     |

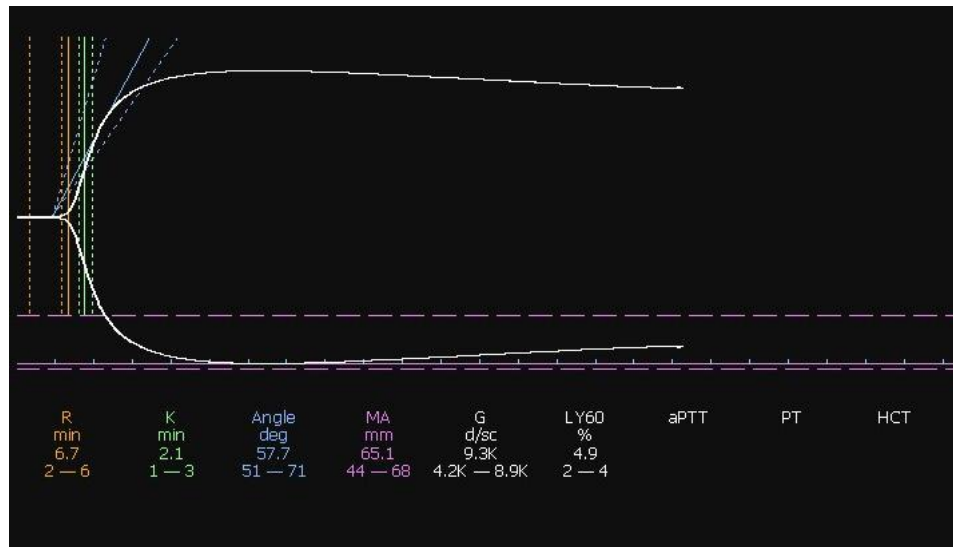
**Figura 30.** Gráficas mostrando los cambios de los parámetros de la tromboelastografía a las 12 h, 24 h, y a los 7 días de vida en los potros neonatos sanos. Existen diferencias estadísticas en:  $\alpha$  (entre 12h-7d), MA (entre 12h-24h, y entre 12h-7d), y en G (entre 12h-24h). Los datos están presentados como la media  $\pm$  DT.



Los resultados de la TEG [expresados como media (DT) y rangos] en todos los potros enfermos están presentados en la Tabla 6. Los valores tromboelastográficos de potros sépticos (Figura 31), fueron significativamente diferentes de los valores en potros sanos, y tuvieron una mayor MA ( $p < 0.001$ ) y valor G ( $p < 0.001$ ), cambios consistentes con hipercoagulación. El  $\alpha$  en el grupo

S fue más amplio que en el grupo NS ( $p < 0.05$ ) pero no existían diferencias cuando se comparó al grupo H. Debido a la alta variabilidad encontrada en el valor LY60, este valor no se consideró fiable y por consiguiente no se compararon los resultados estadísticamente entre los diferentes grupos.

**Figura 31.-** Gráfica de la tromboelastografía de un potro neonato séptico.



Los valores hematológicos (Hto, PT, leucocitos, y PLT), de IgG, y de los perfiles convencionales de la coagulación (TP, TTPa, Fibrinógeno, y AT) de todos los potros están presentados en la Tabla 10.

Se encontraron diferencias estadísticas entre el Hto, TTPa, y el fibrinógeno entre el grupo H y los grupos NS y S. El grupo S tuvo un TTPa prolongado comparado al grupo H ( $p < 0.01$ ); y los potros de los grupos S y NS tuvieron más alto el fibrinógeno que los potros del grupo H ( $p < 0.001$  y  $p < 0.05$ , respectivamente). El grupo NS tuvo más alto el Hto en comparación al grupo S ( $p < 0.01$ ). Los demás parámetros medidos y comparados en este estudio, no presentaron diferencias estadísticas entre los grupos.

**Tabla 10.** Valores hematológicos y perfiles hemostáticos de potros neonatos sanos, enfermos no sépticos, y sépticos expresados como media (DT)

| Parámetros                       | Potros Sanos (H) | Enfermos no sépticos (NS)  | Enfermos sépticos (S)     |
|----------------------------------|------------------|----------------------------|---------------------------|
| Hto (%)                          | 36.68 (4.30)     | 39.20 (5.72) <sup>  </sup> | 32.00 (7.65) <sup>§</sup> |
| PT (g/dL)                        | 6.08 (0.50)      | 5.72 (0.75)                | 5.86 (0.99)               |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L) | 9.98 (1.99)      | 6.74 (2.73)                | 8.95 (6.82)               |
| IgG (mg/dL)                      | >800             | 720 (637.8)                | 654 (633)                 |
| PLT (K/μl)                       | 221.80 (61.15)   | 224.20 (85.72)             | 260.80 (89.70)            |
| TP (s)                           | 12.26 (1.21)     | 12.03 (0.97)               | 13.47 (3.70)              |
| TTPa (s)                         | 46.18 (7.34)     | 69.39 (21.02)              | 95.19 (62.11)*            |
| Fibrinógeno (mg/dL)              | 150.50 (69.67)   | 297.50 (158.20)*           | 476.00 (246.90)*          |
| AT (%)                           | 123.50 (11.08)   | 133.80 (21.54)             | 129.60 (35.45)            |

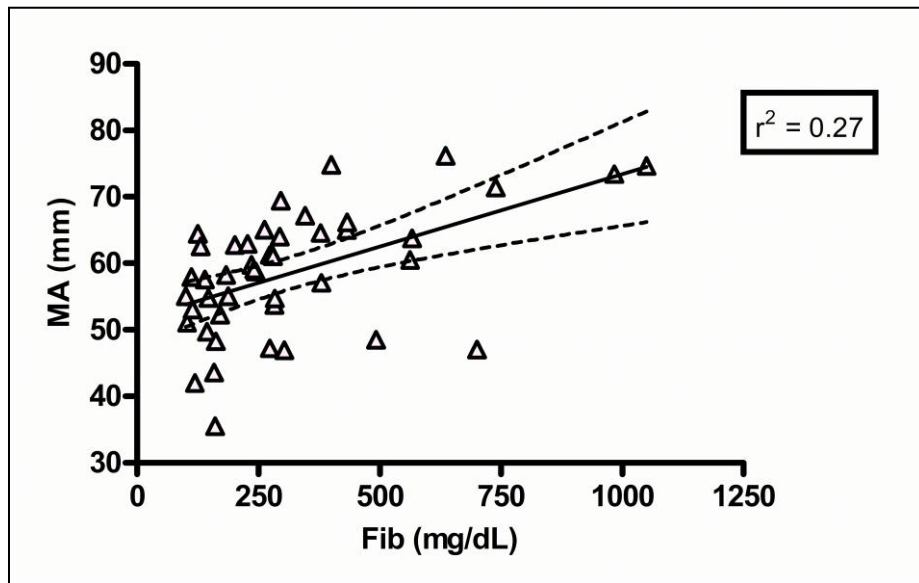
\*Significativamente diferente de los potros del grupo H.

§Significativamente diferente de los potros del grupo NS.

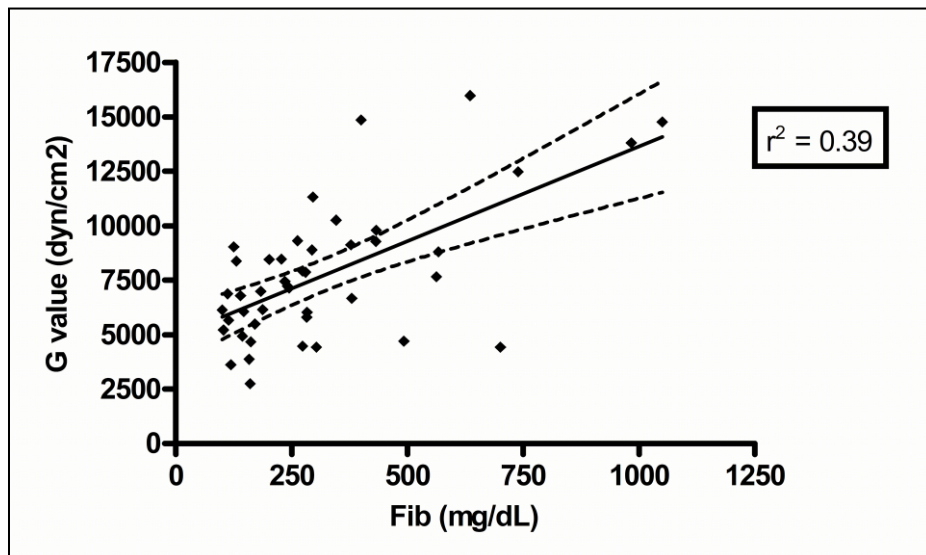
|| Significativamente diferente de los potros del grupo S.

El análisis de regresión mostró una correlación positiva débil entre el fibrinógeno y la MA [ $p < 0.001$ ,  $r^2 = 0.28$ , error estándar del estimado (EES)=7.938] (Figura 32), y entre el fibrinógeno y el G ( $p < 0.001$ ,  $r^2 = 0.39$ , EES=2438) (Figura 33). También se encontró una correlación positiva débil entre las PLT y la MA ( $p = 0.02$ ,  $r^2 = 0.11$ , EES=7.907), y con G ( $p = 0.04$ ,  $r^2 = 0.09$ , EES=2378). Entre el Hto y la MA se encontró una correlación negativa débil ( $p < 0.001$ ,  $r^2 = 0.29$ , EES=7.6), como también con G ( $p < 0.001$ ,  $r^2 = 0.39$ , EES=2354).

**Figura 32.** Gráfica de la regresión lineal entre la MA y el fibrinógeno. La línea de puntos discontinuos indica el intervalo de confianza del 95%.



**Figura 33.** Gráfica de la regresión lineal entre el valor G y el fibrinógeno. La línea de puntos discontinuos indica el intervalo de confianza del 95%.





# DISCUSIÓN





## 6a.- DISCUSIÓN

### 6a.1.- CABALLOS ADULTOS SANOS

En el presente estudio, los valores de TEG encontrados en caballos adultos sanos fueron similares a los resultados recientemente publicados por otros investigadores (Paltrinieri et al., 2008; Epstein et al., 2009, Dunkel et al., 2010). Sin embargo, nuestros resultados muestran tiempos R y K más cortos, y en general gran variabilidad entre individuos para los Tiempos R y K, ángulo, valor G, y LY60. Esta variación no se pudo atribuir a diferencias en la edad o sexo de los animales, ya que no se observaron diferencias estadísticas cuando estos factores fueron comparados.

El amplio intervalo (de 30 a 60 minutos) de almacenaje de las muestras previamente a su análisis, puede haber contribuido potencialmente a la alta variabilidad en el Tiempo R y K, y en el ángulo, ya que así lo han demostrado otros autores (Leclere et al., 2009). Este grupo recomendó fijar el tiempo de almacenaje a 30 minutos, aunque éste no fue posible en nuestro laboratorio, debido a que el tromboelastógrafo se está utilizando actualmente para la clínica de pequeños y grandes animales. Además otros factores como la raza o cambios circadianos pudieron afectar nuestros resultados.

La variabilidad atribuida al operador y que ha sido demostrada por otro grupo científico, es improbablemente la causa en este estudio, pues la misma persona (el doctorando) manejó todas las muestras (Epstein et al., 2009). Los cambios circadianos o diurnos desafortunadamente no fueron tenidos en cuenta en nuestro estudio.

Por otro lado, la variabilidad dentro de la misma muestra no debe ser considerada significativa, ya que los CV de las muestras analizadas en duplicado para el Tiempo-R y K,  $\alpha$ , MA y G fueron insignificantes. Para el valor de la TEG LY60 se encontró una alta variabilidad entre individuos y por

consiguiente no se consideró su comparación con los animales enfermos. Otros grupos de investigadores también han encontrado una alta variabilidad entre individuos (Paltrinieri et al., 2008; Epstein et al., 2009, Dunkel et al., 2010).

La adición de factor tisular podría reducir la variabilidad de los valores en la TEG, aunque esta activación podría también enmascarar casos de hipocoagulación, ya que se ha demostrado que los tiempos R y K se acortan con esta técnica (Epstein et al., 2009). En la actualidad, una técnica que utiliza sangre citratada y recalcificada (sin activación) no ha sido estudiada en profundidad en caballos enfermos, por lo que se necesitan más estudios a este respecto, antes de poder saber cual técnica es superior.

A pesar de la similitud de nuestros resultados con otras publicaciones recientes, creemos que hay suficientes diferencias que nos obligan a recomendar a cada laboratorio, crear sus propios rangos de referencias para caballos adultos (Epstein et al., 2009, Dunkel et al., 2010). En nuestro estudio, el coeficiente de variación para la MA fue el menor (menor del 10%), y la variación dentro de la misma muestra, fue mínima; por lo tanto, ésto nos sugiere que la MA podría ser el valor de la TEG más consistente y fiable para establecer rangos de referencia. Además, Leclere et al. (2009) demostraron que el efecto de almacenaje era mínimo sobre la MA, lo cual podría ser una ventaja cuando se evalúan pacientes.

### **6a.2.- CABALLOS CON COLITIS Y COAGULOPATÍAS SOSPECHADAS**

Los valores de la TEG concordaron con el diagnóstico de hipocoagulación que previamente se había realizado en base a los tiempos prolongados de protrombina y de tromboplastina parcial activada. Previamente otros investigadores han documentado una alta prevalencia de hipocoagulabilidad en caballos con colitis, probablemente debido al desarrollo

de una coagulopatía de consumo en estos pacientes (Dolente et al., 2002). Uno de los tratamientos para esta condición es la administración de productos del plasma, los cuales proveen factores de la coagulación (factor VII). La cantidad necesitada para influenciar positivamente el sistema de coagulación podría ser ajustada o monitorizada mediante TEG secuencial, enfocándola sobre todo a cambios en el tiempo R, tiempo K, el ángulo, y la máxima amplitud.

Basados en nuestros resultados, la TEG fue capaz de detectar un estado hipocoagulable en caballos con trastornos gastrointestinales de tipo inflamatorio y en los cuales se habían diagnosticado previamente coagulopatías. En este aspecto, nuestros resultados no concuerdan con el estudio de Dunkel et al., 2010, ya que ellos encontraron hipercoagulación en un grupo de caballos con trastornos gastrointestinales de tipo isquémico e inflamatorio. La razón de esta contradicción, podría deberse a que en ese estudio, los autores incluyeron caballos con patologías diferentes (estrangulaciones versus colitis) dentro del mismo grupo (Dunkel et al., 2010). En otras especies la TEG también se ha utilizado para la detección de estados hipercoagulables. Para evaluar esta faceta de la TEG en caballos, sería necesario estudiar un gran número de animales en diferentes estados de una enfermedad gastrointestinal inflamatoria. Mientras tanto y en base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, la TEG puede ser añadida al panel convencional de la hemostasis, sobre todo para evaluar casos de hipocoagulación sospechada. Su mayor utilidad sería la evaluación completa del sistema de coagulación y la monitorización de los pacientes.

Antes de determinar si la TEG puede reemplazar a las pruebas convencionales, se necesitan realizar otros estudios clínicos en caballos con cólico y/o colitis.

Los rangos de referencia que nosotros hemos establecido para caballos sanos adultos pueden ayudar a otros laboratorios a establecer los suyos propios. No obstante, nosotros no recomendamos tomar nuestros resultados literalmente para ser usados en otro laboratorio, debido a la gran variabilidad introducida por el operador (Epstein et al., 2009).

### **6a.3.- POTROS NEONATOS SANOS**

Los rangos de referencia calculados para los potros neonatos sanos de este estudio son más amplios y varían ligeramente de los estimados para caballos sanos adultos, al igual que los publicados recientemente (Epstein et al., 2009, Dunkel et al., 2010). El tromboelastógrafo fue muy preciso analizando las muestras de los potros neonatos, como así lo demuestra el bajo coeficiente de variación encontrado, el cual es menor que el publicado anteriormente en caballos y perros (Wiinberg et al., 2005; Paltrinieri et al., 2008). Aquí se detectó una alta variación en potros sanos, los cuales fueron muestreados a las 12h, 24h, y 7 días de edad, sugiriendo cambios fisiológicos en la coagulación de los potros neonatos durante los primeros días de vida, como ya ha sido previamente detallado por otros investigadores (Barton et al., 1995).

Los cambios circadianos en la coagulación, también han podido afectar a nuestros resultados, pero hasta la fecha, estos cambios no han sido suficientemente estudiados en la especie equina, y tampoco se hizo en este estudio. Aunque el número de animales sanos a los que se les tomaron varias muestras (un total de 3) en la primera semana de vida, fue bajo (solamente 5 potros), y hacen falta más estudios a este respecto, nuestros hallazgos sugieren que la edad del potro es un dato importante a tomar en cuenta cuando se quiera monitorizar la coagulación de los neonatos equinos.

Idealmente, los laboratorios que analicen la coagulación mediante tromboelastografía, deberían establecer rangos de referencia independientes para cada intervalo de edades diferentes. Además, la alta variabilidad encontrada entre individuos (potros), podría atribuirse a los cambios hemostáticos que ocurren durante el primer mes de vida (Barton et al., 1995), aunque la variabilidad entre razas o el tiempo de almacenaje, también han podido influenciar en los resultados considerablemente. Como ya dijimos anteriormente, la homogeneización del tiempo de almacenaje a 30 minutos

antes del análisis tromboelastográfico podría haber reducido la variabilidad (Leclere et al., 2009).

La variación entre individuos no puede explicarse debido al sexo de los potros ya que no se encontraron diferencias estadísticas entre ellos. Por otro lado, la influencia del operador y manipulador de las muestras debe considerarse mínima ya que la misma persona (el doctorando) llevo a cabo tanto la recogida de muestras como los análisis tromboelastográficos. Como ya comentamos anteriormente en la sección de caballos adultos sanos, Epstein et al. (2009) recomendaron la adicción del factor tisular a las muestras sanguíneas para así minimizar la variabilidad. Esto tendría incluso más importancia en el análisis tromboelastográfico de los neonatos, y es algo que sin duda se debería considerar en futuros estudios con potros recién nacidos.

### **6a.4.- POTROS NEONATOS ENFERMOS Y SÉPTICOS**

En nuestros resultados se observaron diferencias estadísticas en algunos de los parámetros de la TEG, sobre todo cuando comparamos los potros sanos con el grupo de sépticos. Estos resultados se deben de interpretar con precaución, debido a que se utilizaron dos técnicas diferentes (punción de la vena yugular versus catéter) para la toma de muestras en estos grupos (H y S). Sin embargo y a pesar de esta fuente de variación, no se observaron diferencias estadísticas entre el grupo de potros sanos y el grupo de animales enfermos no sépticos (muestras también tomadas mediante diferentes técnicas).

La edad media de los grupos podría explicar en cierto grado estas diferencias, al haberse visto una tendencia con la edad hacia un mayor ángulo, y mayores máxima amplitud y valor G. Sin embargo, las diferencias encontradas en los parámetros de la TEG (MA y valor G) en el grupo S, podrían sugerir que las muestras de sangre de estos potros sépticos, son capaces de crear coágulos más fuertes; por consiguiente, este dato se podría

interpretar como una tendencia a la hipercoagulabilidad en este grupo. Por el contrario, otro estudio de tromboelastografía en equinos adultos observó hipercoagulación en base a un tiempo R acortado respecto al grupo control (animales sanos) (Dunkel et al., 2010), lo cual no fue detectado en este trabajo de tesis doctoral.

Los hallazgos indicativos de hipercoagulación coinciden con un estudio reciente de la concentración de dímeros D (un producto de la degradación de la fibrina) en potros neonatos sépticos, el cual reveló una marcada activación de la coagulación en potros con septicemia (Armengou et al., 2008). Además, nuestros potros sépticos tuvieron las concentraciones de fibrinógeno más altas, lo cual estaba positivamente correlacionado con la MA y el valor G en este proyecto y con la MA en un estudio previo (Epstein et al., 2009).

En general, las correlaciones detectadas entre los parámetros de la TEG y los valores hematológicos y hemostáticos fueron modestos y menores de lo que nosotros habíamos hipotetizado. Los potros sépticos tuvieron un TPPa prolongado, lo cual podría estar indicando un déficit de los factores de coagulación debido al consumo de los mismos. Varios investigadores han descrito tiempos de coagulación prolongados y un incremento en la concentración en los productos de la degradación del fibrinógeno en potros neonatos sépticos (Barton et al., 1998; Armengou et al., 2008; Bentz et al., 2009).

La hipercoagulabilidad observada con el análisis tromboelastográfico en potros sépticos contrasta con la hipocoagulabilidad vista en las pruebas tradicionales de la coagulación (tiempos de coagulación prolongados). Pero considerando que un proceso de coagulación intravascular diseminada (CID) es típicamente caracterizado por una etapa temprana de hipercoagulación, seguida por un consumo masivo de factores de coagulación y finalmente un estado de hipocoagulación, es posible que las diferentes pruebas estén demostrando ambos estados (hipercoagulación e hipocoagulación) dentro de un mismo animal.

Un estado de hipercoagulación también fue sugerido en el estudio de la concentración de dímeros D en potros sépticos, donde los dímeros D estaban significativamente incrementados 24 horas después de la hospitalización y en comparación con el momento de la admisión (Armengou et al., 2008). Los resultados de nuestro estudio sugieren que la TEG puede estar detectando hipercoagulación en un estado más temprano (en admisión al hospital) y esto puede ser muy beneficioso para poder comenzar un tratamiento lo antes posible. Desafortunadamente, en nuestro estudio, no tuvimos accesibilidad al análisis de las concentraciones de dímeros, lo cual habría sido muy interesante.

Tampoco se realizaron análisis a las 24 y 48 horas de la admisión a nuestro hospital, hecho que hubiera sido de utilidad, sobre todo para monitorizar la progresión de los animales. En el estudio realizado por Dunkel et al., 2010, los investigadores encontraron hipercoagulación en caballos adultos con trastornos gastrointestinales y cuando realizaron un segundo análisis tromboelastográfico a las 48 horas, observaron una tendencia a la hipocoagulación. Quizás, la utilidad de la monitorización sería incluso mayor para casos donde hay sospechas de coagulación intravascular diseminada, monitorización de su tratamiento y progresión. La baja mortalidad de potros enfermos incluidos en nuestro estudio, no permitió la comparación entre animales muertos o eutanasiados y los sobrevivientes. Un estudio de la coagulación en potros neonatos utilizando otra técnica viscoelastográfica (Sonoclot), mostró que los animales con disminución de la formación de coágulos, tenían más probabilidades de morir o ser eutanasiados (Dallap Schaer et al., 2009). Igualmente, una máxima amplitud disminuida (muestras tomadas en la admisión) en caballos con trastornos gastrointestinales ha sido asociado con incremento en la mortalidad (Dunkel et al., 2010).

Nuestros resultados muestran que la tromboelastografía podría proveer información adicional sobre el sistema hemostático de potros neonatos. Pero antes de su uso clínico en estos pacientes, los autores recomiendan que cada laboratorio obtenga independientemente sus propios valores de referencia para potros neonatos y caballos adultos, y que la técnica tromboelastográfica sea



completamente estandarizada para así reducir su variabilidad. Además, vista la gran variabilidad en los parámetros de la TEG durante los primeros días de vida en potros neonatos, los rangos de referencia para estos animales, se deben de calcular para edades exactas.

Finalmente, más estudios incluyendo un mayor número de animales sanos y enfermos contribuirían al desarrollo de esta técnica en veterinaria y desvelaría si la TEG tiene algún valor pronóstico o no.

## 6b.- DISCUSSION

### 6b.1.- HEALTHY ADULT HORSES

In the present study, TEG values obtained from healthy horses were similar to results reported in other recent publications ( Paltrinieri et al., 2008, Epstein et al., 2009; Leclere et al., 2009; Dunkel et al., 2010). Our results showed a high inter-individual coefficient of variation (CV) for the R time, K time,  $\alpha$ , G, and LY60 in healthy horses. This variation could not be explained by age or gender, as no differences between age or gender groups for the TEG variables were observed. Variations in storage time could potentially contribute to the high variability on R, K, and  $\alpha$  because it has been reported to affect their values (Leclere et al., 2009). A fixed storage time of 30 minutes has been recommended, but it was not always feasible in our laboratory because the thromboelastograph is currently being used in clinical small and large animal cases. In addition, other influencing factors could be breed and daily variations or high inter-individual variability. It is unlikely in our study that variation was due to operator handling, since all TEG testing was performed by the same individual. Circadian and diurnal variation in TEG variables were not addressed in this study. The intra-assay variability was not likely a factor, since the CVs from duplicated samples for R, K,  $\alpha$ , MA and G were negligible. We found a high inter-individual variability in healthy horses for LY60; therefore we did not compare this variable in the clinical cases. Large inter-individual variation of TEG values in horses has also been demonstrated by other groups (Paltrinieri et al., 2008; Epstein et al., 2009; Leclere et al., 2009; Dunkel et al., 2010).

Although addition of tissue factor may reduce variability in TEG values, the activation of clotting by tissue factor may mask true hypocoagulability (Epstein et al., 2009). Citrated recalcified (non-activated) and tissue factor (activated) TEG have not been compared in sick horses, so further study is needed to determine whether one method is superior in clinical cases. While our results are similar to previously reported reference ranges, there are enough differences to warrant establishing reference ranges for each individual

laboratory (Epstein et al., 2009). In our study, the coefficient of variation for MA was the lowest (less than 10%), and intra-assay variation was minimal, suggesting that this TEG value could be the most consistent and reliable variable for establishing reference ranges in horses. Furthermore, Leclere et al. (2009) showed no significant effect of storage time on MA, an advantage when evaluating clinic patients.

### **6b.2.- HORSES WITH COLITIS AND SUSPECTED COAGULOPATHIES**

Statistical differences were observed when mean TEG values from healthy horses were compared to those in sick horses, suggesting hypocoagulability in the colitis group (longer R and K, narrower  $\alpha$ , and decreased MA and G). These findings do not agree with thromboelastographic values of another equine study where authors found hypercoagulation in horses with ischemic and inflammatory gastrointestinal disorders (Dunkel et al., 2010). This disagreement could be due to the inclusion of horses with two different pathologic conditions (ischemia versus inflammation) in the same group (Dunkel et al., 2010).

Our results suggest that citrated recalcified TEG is a useful technique to evaluate the coagulation system and can detect clotting abnormalities in horses with colitis and abnormal clotting times. However, there was substantial overlap between the normal range and the values for sick horses, so TEG may not be reliable as a stand-alone test. There was modest correlation of aPTT with R and K time; however, the extent of correlation between TEG and traditional coagulation testing was less than we had hypothesized. Surprisingly, the group of colitis horses had decreased MA despite having increased FIB and PLT, conditions that have been reported in horses and other species to correlate with an increased MA (Wiinberg et al., 2008; Epstein et al., 2009). In addition, the differences in PCV seen in our study might have influenced the TEG values since it has been negatively correlated with MA in humans and with the velocity

of clot formation in horses (Iselin et al., 2001; Paltrinieri et al., 2008). It is possible that other factors, such as a decrease in coagulation proteins, contributed to the decrease in MA in the colitis group.

TEG values supported a diagnosis of hypocoagulability in horses with colitis who also had prolonged PT and/or aPTT. Previous investigators have documented a high prevalence of hypocoagulability in horses with colitis, likely due to a consumptive coagulopathy (Dolente et al., 2002). Possible therapy for this condition includes administration of fresh frozen plasma which provides coagulation factors (fibrinogen and factors II, V, VII, IX, X, XI, XII). The amount needed to influence positively the coagulation system could be adjusted and monitored by sequential TEG analysis, focusing on changes in R, K,  $\alpha$ , and MA.

Based on our data, TEG values support a diagnosis of hypocoagulability in horses with inflammatory gastrointestinal disorders and a previously determined coagulopathy. Data in other species suggests that TEG may be especially useful for detection of hypercoagulable states. A larger number of cases and various stages of severity of gastrointestinal inflammatory conditions would be needed to assess the clinical utility of TEG for detection of hypercoagulability in horses. TEG may be a valuable addition to the "hemostasis panel" in horses, particularly in those with suspected hypocoagulability. It could be especially useful to characterize the entire coagulation process and to monitor treatments. Further prospective clinical studies are needed to determine whether TEG could replace traditional coagulation testing for the evaluation of equine patients with colic or colitis.

Our laboratory reference ranges for healthy horses could be used to help establish reference values in different laboratories. Due to the operator's influence reported by other authors and our own experience, we recommend that each laboratory evaluate a group of healthy horses in order to establish their own reference ranges.

### **6b.3.- HEALTHY NEONATAL FOALS**

The reference ranges obtained for healthy neonatal foals in this study are wider and slightly different from those reported for adult horses (Epstein et al., 2009, Dunkel et al., 2010). The thromboelastograph<sup>i</sup> was very precise, as demonstrated by low intra-assay CV, which was lower than that reported for adult horses and dogs (Wiinberg et al., 2005; Paltrinieri et al., 2008). A high variation was detected in healthy foals that were tested over time (12h, 24h and 7 days of age), suggesting coagulation changes in neonatal foals during the first days of life, as previously reported (Barton et al., 1995). Circadian coagulation changes might have also affected the results but to date those changes have not been studied in the equine species, and were not addressed in this study. Although the number of animals tested over time in our study was low and more studies are needed, this finding should be considered when monitoring treatments using TEG in neonatal foals. Ideally, coagulation laboratories should establish reference values for very specific age groups of neonates. In addition, the high inter-individual variability seen in this study could be attributed to the hemostatic changes that occur in foals during the first month of life (Barton et al., 1995), although breed variability and storage time could also have influenced the results. In a previous study, a fixed storage time of 30 minutes before TEG analysis was recommended, but it was not always feasible in our study because the thromboelastograph<sup>i</sup> is often being used for hospital patients (both small and large animal) (Leclere et al., 2009). The inter-individual variation could not be explained by gender, as no differences between gender groups were observed. Moreover, the operator influence should be considered minimal, as the same operator performed all the tests. The addition of tissue factor has been recommended to minimize TEG variability in adult horses and it should also be considered in future studies involving neonatal foals, because the high inter-individual variability reduces its utility (Epstein et al., 2009).

#### **6b.4.- SICK NON-SEPTIC AND SEPTIC NEONATAL FOALS**

Statistically significant differences were found in some of the TEG variables between healthy and septic foals. These results should be interpreted carefully because two different blood collection techniques (venipuncture vs catheter) were utilized. Despite this potential source of bias no statistical differences were found between the H group and the NS group. Age could explain these statistical differences since changes towards wider  $\alpha$ , greater MA and G were detected in the small group of healthy foals that was evaluated over time. However, the differences in TEG variables (MA and G) in the S group could also suggest that blood samples from this group were able to generate stronger clots, which suggests a trend toward hypercoagulability in this group. In a previous study, investigators based the diagnosis of hypercoagulation in horses with gastrointestinal disorders in a shorter R-time than controls, which was not seen in the septic neonatal foals evaluated in our study (Dunkel et al., 2010). Our findings are consistent with a recent study of D-Dimer concentration (a fibrin-linked degradation product from fibrinolysis) in septic foals, which revealed a marked activation of coagulation in foals with septicemia (Armengou et al., 2008). Furthermore, septic foals in our study had the highest Fib, which was positively correlated with MA and G in the present study and with MA in a previous study (Epstein et al., 2009). In general, the correlations detected between TEG variables and hemostatic and hematologic values were modest and less than we had hypothesized. A prolonged aPTT was seen in septic foals, which could indicate a deficit of coagulation factors due to consumption. Prolonged clotting times and increased concentration of fibrin degradation products in septic equine neonates have been reported by several investigators (Barton et al., 1998; Armengou et al., 2008; Bentz et al., 2009).

The hypercoagulability shown on TEG testing in septic foals contrasts with the hypocoagulability demonstrated with traditional coagulation testing (prolonged aPTT). Since DIC is typically characterized by an early hypercoagulable state leading to depletion of coagulation factors, it is possible that the different methods of testing are demonstrating the hypercoagulable and

hypocoagulable processes that are occurring at the same time. Hypercoagulation has also been suggested by D-dimer concentration which is significantly higher in septic foals 24 hours after hospitalization than at admission (Armengou et al., 2008). The results of our study suggest that TEG may be detecting hypercoagulation in an earlier stage (on admission) which would be beneficial to implement a prompt treatment. Unfortunately, D-dimer concentrations were not available for comparison for the foals in our study. Further evaluation and repeated TEG analyses at 24 and 48 hours from presentation were not performed in this study; however, serial TEGs may be useful in cases of suspected DIC in order to monitor the progression of the condition. In this study, no comparison was attempted between survivors and non-survivors because of the low number of animals that died or were euthanized. One study using a viscoelastic analyzer (Sonoclot) in septic foals showed that animals with decreased clot rate were more likely to be euthanized or die (Dallap Schaer et al., 2009).

TEG could be used to provide additional information about the hemostatic system in equine neonates. The authors recommend that reference ranges for healthy neonatal foals be obtained independently from adult horses and that the technique be standardized to reduce its variability. In addition, age-specific reference ranges may need to be developed for neonates since there is significant variation in several TEG variables during the first week of life. Further studies including a larger number of clinical cases are needed to see if TEG has any value as prognostic indicator.

# CONCLUSIONES



## Conclusiones

---

## 7a.- CONCLUSIONES

1º.- Los parámetros tromboelastográficos (Tiempo-R, Tiempo-K, ángulo  $\alpha$ , máxima amplitud y valor G) aportan información adicional en la evaluación de la coagulación en los équidos.

2º.- En potros neonatos sanos existe una gran variabilidad entre los parámetros de la TEG, entre individuos y en el mismo individuo dentro de la primera semana de vida; por consiguiente, es difícil establecer valores de referencia en este grupo.

3º.- La tromboelastografía fue capaz de detectar hipocoagulación en aquellos caballos con colitis y con tiempos de coagulación (TTPa y TP) prolongados.

4º.- La tromboelastografía detectó cambios en la coagulación consistentes con hipercoagulación en el grupo de potros neonatos sépticos.

5º.- Las correlaciones encontradas entre los valores tromboelastográficos y las pruebas convencionales para la evaluación de la hemostasia (PLT, TTPa, TP, y FIB) fueron débiles en general.

## Conclusions

---

## 7b.- CONCLUSIONS

1º.- Thromboelastographic variables (R-Time, K-Time, angle, maximum amplitude y G value) provide additional information about the hemostatic system in horses.

2º.- Thromboelastography has a high interindividual variability in equine neonates, and also within the same individual over the first week of life; therefore, reference values are difficult to establish in this group.

3º.- Thromboelastography was able to detect hypocoagulation in horses with colitis and prolonged clotting times (aPTT y PT).

4º.- Thromboelastography showed changes consistent with hypercoagulability in the neonatal septic foals group.

5º.- Correlations between thromboelastographic variables and the conventional hemostatic tests (PLT, aPTT, PT, y FIB) were weak in general.

## Conclusions

---

# RESUMEN



## 8a.- RESUMEN

**Objetivos** – Analizar y establecer rangos de referencia para los parámetros de la tromboelastografía en sangre citratada y recalcificada en caballos adultos y potros neonatos sanos. Evaluar la TEG, los valores hematológicos, y las técnicas tradicionales de evaluación de la coagulación en caballos con colitis y coagulopatías sospechadas. Analizar los trastornos hemostáticos en potritos neonatos enfermos con septicemia y por otras causas mediante TEG, valores hematológicos y con las técnicas tradicionales de evaluación de la coagulación. Además, comparar y establecer correlaciones entre los resultados de la TEG y las técnicas tradicionales para el diagnóstico de patologías hemostáticas en los équidos.

**Diseño** – Estudio prospectivo observacional, realizado entre Agosto del 2007 y Junio del 2009.

**Animales** – 45 caballos adultos sanos, 18 potros neonatos sanos, 12 caballos adultos con colitis y tiempos de protrombina (TP) y tromboplastina parcial activada (TTPa) prolongados, 15 potros neonatos enfermos no sépticos, y 17 potros neonatos sépticos.

**Material y Métodos** – Se sacaron dos muestras sanguíneas en citrato sódico (3.2%) para evaluar la hemostasis mediante tromboelastografía [Tiempo-R (R), Tiempo-K (K), ángulo ( $\alpha$ ), máxima amplitud (MA), valor G (G), lisis a los 60 minutos (LY60)] y con las pruebas tradicionales de la coagulación [TP, TTPa, PLT, Fib, y AT (solo en los potros)]. Además, se recogieron los siguientes datos de la historia clínica en los potros enfermos: la edad, raza, motivo por el que fue hospitalizado, puntuación de sepsis, resultados de cultivo sanguíneo y si se le dio el alta o no.

**Resultados** – CABALLOS ADULTOS: Los valores medios (DT) para los parámetros de la TEG en caballos sanos fueron: R = 10.4 (3.1) min; K = 3.5 (1.2) min;  $\alpha$  = 46.3 (11.0) grados; MA = 55.6 (5.1) mm; G = 6429 (1341) dyn/cm<sup>2</sup>, y LY60 = 5.1 (2.4) %. La media de los coeficientes de variación entre individuos y dentro de la misma muestra para los parámetros de la TEG en



caballos sanos fueron: R = 30.7/4.7%, K = 35.3/4.8%,  $\alpha$  = 23.8/4.4%, MA = 9.3/1.4%, G = 20.8/3.4%, y LY60 = 47.7/13.1%, respectivamente. Los caballos con colitis y tiempos prolongados de protrombina y tromboplastina parcial activada mostraron mayores valores medios de R ( $p < 0.001$ ) y K ( $p < 0.001$ ),  $\alpha$  más reducidos ( $p < 0.001$ ), MA más pequeñas ( $p = 0.001$ ) y valores G reducidos ( $p = 0.02$ ); cambios consistentes con hipocoagulabilidad.

**POTROS NEONATOS:** Los valores medios (DT) para los parámetros de TEG en potros neonatos sanos fueron: R= 11.82 (5.35) min, K = 3.06 (1.34) min,  $\alpha$  = 51.19 (12.66) grados, MA = 55.06 (6.67) mm, G = 6,361 (1,700) dyn/cm<sup>2</sup>, y LY60 = 2.71 (2.59) %. La media de los coeficientes de variación entre individuos, dentro de la misma muestra, y para el mismo individuo a las 12 h, 24h, y 7 días de vida para los parámetros de la TEG en potros sanos fueron: R= 45.2/3.5/43.1%, K=58.7/5.3/28.7%,  $\alpha$  =24.7/1.5/11.9%, MA=12.1/0.3/6.1%, G=26.7/1.6/14.7%, y LY60=95.5/5.4/69.5%, respectivamente. Los potros sépticos tuvieron mayores MA ( $p < 0.001$ ) y G ( $p < 0.001$ ) que los potros sanos y enfermos no sépticos, cambios consistentes con hipercoagulación. Las correlaciones detectadas entre los parámetros de la TEG y los valores hematológicos y hemostáticos fueron débiles.

**Conclusiones** – Los parámetros tromboelastográficos (Tiempo-R, Tiempo-K,  $\alpha$ , MA y G) aportan información adicional en la evaluación de la coagulación en los équidos. En potros neonatos sanos, existe una gran variabilidad entre los parámetros de la TEG entre individuos y en el mismo individuo dentro de la primera semana de vida; por consiguiente, es difícil establecer valores de referencia en este grupo. Además, la TEG fue capaz de detectar hipocoagulación en aquellos caballos con colitis y con tiempos de coagulación (TTPa y TP) prolongados. La TEG también detectó cambios en la coagulación consistentes con hipercoagulación en el grupo de potros neonatos sépticos. Finalmente, las correlaciones encontradas entre los valores tromboelastográficos y las pruebas convencionales para la evaluación de la hemostasia (PLT, TTPa, TP, y FIB) fueron débiles en general.

## 8b.-SUMMARY

**Objectives.-** To evaluate citrated recalcified (non-activated) thromboelastography (TEG) variables and establish reference intervals in healthy adult horses and healthy newborn foals. To assess TEG variables, hematologic values and conventional coagulation profiles from horses with colitis and suspected coagulopathies. To evaluate TEG variables, hematologic values and conventional coagulation profiles from sick non-septic and septic foals. Additionally, to compare and establish correlations between TEG values and conventional coagulation profiles.

**Design –** Prospective, observational. From August 2007 to June 2009.

**Animals -** 45 healthy adult horses, 18 healthy neonatal foals, 12 sick adult horses with colitis and prolonged prothrombin time (PT) and/or activated partial thromboplastin time (aPTT), 15 neonatal sick non-septic foals, and 17 neonatal sick septic foals.

**Material y Methods -** Two citrated (3.2%) blood samples were submitted for hemostatic evaluation using a TEG analyzer and a conventional coagulation profile. Coagulation profile [PT, aPTT, PLT, Fib, and AT(only foals)] and citrated recalcified whole blood TEG analysis [R-Time (R), K-Time (K), angle ( $\alpha$ ), maximum amplitude (MA), G value (G), lysis at 60 minutes (LY60)] were evaluated. In addition, signalment, presenting complaint, sepsis scores, blood culture results, and outcomes were recorded from medical records in the sick foals.

**Main Results - ADULT HORSES:** Mean values (SD) for TEG parameters in healthy horses were: R = 10.4 (3.1) min; K = 3.5 (1.2) min;  $\alpha$  = 46.3 (11.0) degrees; MA = 55.6 (5.1) mm; G = 6429 (1341) dyn/cm<sup>2</sup>, and LY60 = 5.1 (2.4) %. Mean coefficients of variation for inter-individual/intra-assay variability in healthy horses were: R = 30.7/4.7%, K = 35.3/4.8%,  $\alpha$  = 23.8/4.4%, MA = 9.3/1.4%, G = 20.8/3.4%, and LY60= 47.7/13.1%, respectively. Horses with colitis and prolonged PT and /or aPTT had longer mean values for R (p<0.001) and K (p<0.001), narrower mean  $\alpha$  (p<0.001), decreased mean MA (p=0.001) and smaller mean G (p=0.02); changes consistent with hypocoagulability.

**NEONATAL FOALS:** Mean values (SD) for TEG variables in healthy neonatal foals were: R = 11.82 (5.35) min, K = 3.06 (1.34) min,  $\alpha$  = 51.19 (12.66) degrees, MA = 55.06 (6.67) mm, G = 6,361 (1,700) dyn/cm<sup>2</sup>, and LY60 = 2.71 (2.59) %. Mean coefficients of variation for inter-individual/intra-assay/daily variability in healthy foals were: R = 45.2/3.5/43.1%, K = 58.7/5.3/28.7%,  $\alpha$  = 24.7/1.5/11.9%, MA = 12.1/0.3/6.1%, G = 26.7/1.6/14.7%, and LY60 = 95.5/5.4/69.5%, respectively. Septic foals had greater MA (p<0.001) and G (p<0.001) than healthy and sick non-septic foals, changes consistent with hypercoagulability. Weak correlations were detected between TEG variables and hematologic or hemostatic values.

**Conclusions** - TEG variables (R-Time, K-Time,  $\alpha$ , MA, and G) provide additional information about the hemostatic system in horses. TEG has a high interindividual variability in equine neonates, and also within the same individual over the first week of life; therefore, reference values are difficult to establish in this group. Additionally, TEG was able to detect hypocoagulation in horses with colitis and prolonged clotting times (aPTT y PT). It also showed changes consistent with hypercoagulability in the neonatal septic foals group. Finally, correlations between thromboelastographic variables and the conventional hemostatic tests (PLT, aPTT, PT y FIB) were weak in general.

## 9.-AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la culminación de este trabajo de investigación:

- A mis padres, por su apoyo incondicional, poniendo todo lo necesario a mi alcance para poder realizar este trabajo; y por educarme con los mejores estándares, su ejemplo diario de esfuerzo y superación.
- A Sara, por siempre confiar en mí, ayudarme en todo lo posible, mostrarme su cariño y amor diario, y lo más importante, estar siempre a mi lado aunque eso suponga dejar atrás y renunciar a otras muchas cosas.
- A mis directores, los Doctores Indalecio Ruiz Calatrava y Rafael Jesús Gómez Villamandos, por su colaboración y dirección en este trabajo de Tesis Doctoral, mostrándome siempre su apoyo y ánimos para poder conseguir todas mis metas profesionales.
- A mi tutor académico, Don. Guillermo Couto, por iniciarme en la investigación, poner a mi disposición su laboratorio de hematología y trombosis para poder llevar a cabo todos los experimentos, y por su ayuda en la redacción y corrección de todas las publicaciones resultantes de este proyecto.
- A mi supervisora, la profesora Margaret Mudge, por su participación en este trabajo de investigación y todas las aportaciones de conocimiento realizadas al respecto. Además, quiero especialmente agradecerle toda la orientación, ayuda, y consejos que me dio durante mi internado.
- A Paulo Vilar Saavedra, por su participación en este trabajo de investigación y su ayuda con la toma y el procesamiento de las muestras.
- A todos los profesores, residentes y técnicos del servicio de medicina y cirugía del Hospital de Caballos de The Ohio State University, por

## Agradecimientos

---

su ayuda con el manejo de los pacientes equinos y la toma de muestras para este trabajo.

- A todo el grupo que trabaja en el banco de sangre de la Facultad de Veterinaria de The Ohio State University; Liliana, Sara, Cristina, Nicole, Ashley, Stacey y Dawn, por su ayuda con el procesamiento de muestras.
- Y todas aquellas personas que de una u otra forma, hayan podido colaborar en esta Tesis, muchas gracias.

# BIBLIOGRAFÍA

## Bibliografía

---

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

Adelstein RS, Conti MA. (1975). Phosphorylation of platelet myosin increases actinactivated myosin ATPase activity. *Nature*, 256(5518): 597–598.

Alkjaersig N, Fletcher NP, Sherry S. (1959). The mechanism of clot dissolution by plasmin. *J Clin Invest*, 38:1086–1080.

Aoki N, Moroi M, Sakata Y, et al. (1978). Abnormal plasminogen. A hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis. *J Clin Invest*, 61(5):1186–1195.

Aoki N, Wall MJ, Demsar J, et al. (2000). Predictive model for survival at the conclusion of a damage control laparotomy. *American Journal of Surgery*, 180 540-4; discussion 544-5.

Armengou L, Monreal L, Tarancon I, et al. (2008). Plasma D-dimer concentration in sick newborn foals. *J Vet Intern Med*, 22: 411-7.

Barton MH, Morris DD, Crowe N, et al. (1995). Hemostatic indices in healthy foals from birth to one month of age. *J Vet Diagn Invest*, 7: 380-5.

Barton MH, Morris DD, Norton N, et al. (1998). Hemostatic and fibrinolytic indices in neonatal foals with presumed septicemia. *J Vet Intern Med*, 12:26-35.

Bennett JS, Vilaire G. (1979). Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest*, 64(5): 1393–1401.

Bentz AI, Palmer JE, Dallap BL, et al. (2009). Prospective evaluation of coagulation in critically ill neonatal foals. *J Vet Intern Med*, 23:161-7.



Bernard W, Morris DD, Divers TJ, et al. (1987). Plasma antithrombin-III values in healthy horses: effect of sex and/or breed. *Am J Vet Res*, 48: 866-8.

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369: 64–67.

Besborod'ko BN, and Tishchenko GD. (1971). Thrombelastographic evaluation of blood coagulation in patients with bronchial asthma at the time of onset and during the extraparoxymsmal period. *Ter Arkh*, 43: 48-51.

Blomback B, Blomback M. (1972). The molecular structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*, 202: 77–97.

Boffa MB, Koschinsky ML. (2007). Curiouser and curiouser: Recent advances in measurement of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and in understanding its molecular genetics, gene regulation, and biological roles. *Clin Biochem*, 40(7):431-42.

Boudreaux MK. (2008) Characteristics, diagnosis, and treatment of inherited platelet disorders in mammals. *J Am Vet Med Assoc*, 233(8): 1251-59.

Bradford HN, DeLa Cadena RA, Kunapuli SP, et al. (1997). Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the GP Ib-IX-V complex. *Blood*, 90:1508–1515.

Brewer BD, and Koterba AM. (1988). Development of a scoring system for the early diagnosis of equine neonatal sepsis. *Equine Vet J*, 20:18-22.

Brianceau P and Divers TJ. (2001). Acute thrombosis of limb arteries in horses with sepsis: five cases (1988-1998). *Equine Vet J*, 33:105-109.

Broze GJ Jr, Warren LA, Novotny WF, et al. (1988). The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits

- factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood*, 71(2): 335–343.
- Brooks M, Leith GS, Allen AK, et al. (1991). Bleeding disorder (von Willebrand disease) in a quarter horse. *J Am Vet Med Assoc*, 198: 114-6.
- Burghardt WR, Goldstick TK, Leneschmidt J, et al. (1995). Nonlinear viscoelasticity and the thrombelastograph: 1. Studies on bovine plasma clots. *Biorheology*, 32: 621-30.
- Burns C. (2004a). Routine Hematology Procedures. In: *Clinical Laboratory Hematology*. Pearson Education. Upper Saddle River, New Jersey.
- Burns MS. (2004b). Laboratory Testing in Coagulation. In: *Clinical Laboratory Hematology*. Pearson Education. Upper Saddle River, New Jersey.
- Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S. (1987) Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1987; 316(10): 581–589.
- Coakley M, Reddy K, Mackie I. et al. (2006). Transfusion triggers in orthotopic liver transplantation: a comparison of the thromboelastometry analyzer, the thromboelastogram, and conventional coagulation tests. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 20: 548-53.
- Collen D. (1980). On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost*, 43(2): 77–89.
- Colman RW. (1990). Platelet receptors. *Hematol Oncol Clin North Am*, 4:27–42.
- Colman RW. (1999). Biologic activities of the contact factors in vivo: potentiation of hypotension, inflammation, and fibrinolysis, and inhibition of cell adhesion, angiogenesis, and thrombosis. *Thromb Haemost*, 82: 1568–1577.

Colman RW. (1999). Platelet cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: Rao GHR, ed. Handbook of platelet physiology and pharmacology. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 251–267.

Colman RW, Clowes, AW, George JN, et al. (2006). Part I- Basic Principles of Hemostasis and Thrombosis: Overview of Hemostasis. In Colman RW: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th Edition. Lippincott Williams Wilkins.

Colman RW, Jameson BA, Lin Y, et al. (2000). Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatin) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood*, 95(2): 543–550.

Colman RW, White JV, Scovell S, et al. (1999). Kininogens are antithrombotic proteins in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 2245–2250.

Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, et al. (1983). Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest*, 71(6): 1893–1896.

CoPoort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. (1996). A common genetic variation in the region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 88: 3698–3703.

Cui Y, Hei F, Long C, et al. (2009). Perioperative monitoring of thromboelastograph on hemostasis and therapy for cyanotic infants undergoing complex cardiac surgery. *Artificial Organs*, 33: 909-914.

Dallap Schaer BL, Bentz AI, Boston RC, et al. (2009). Comparison of viscoelastic coagulation analysis and standard coagulation profiles in critically ill neonatal foals to outcome. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 19: 88-95.

Dallap Schaer BL and Epstein K. (2009). Coagulopathy of the critically ill equine patient. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 19: 53-65.

De Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, 100(4): 1310–1317.

de Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, et al. (2003). Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med*, 17: 674-9.

De Matteis F and Barbano G. (1963). The thrombelastogram in coronary disease. *Minerva Med*, 54: 194-202.

Delgado MA, Monreal L, Armengou L, et al. (2009). Peritoneal D-dimer concentration for assessing peritoneal fibrinolytic activity in horses with colic. *J Vet Intern Med*, 23: 882-889.

Della Santa R and Duraffourd P. (1954). Respective values of thromboelastography by Harterl and of the heparin tolerance test in vitro in thrombophilic states. *Schweiz Med Wochenschr*, 84: 1128-30.

Dolente BA, Beech J, Lindborg S, et al. (2005). Evaluation of risk factors for development of catheter-associated jugular thrombophlebitis in horses: 50 cases (1993-1998). *J Am Vet Med Assoc*, 227: 1134-41.

Dolente BA, Wilkins PA, and Boston RC. (2002). Clinicopathologic evidence of disseminated intravascular coagulation in horses with acute colitis", *J Am Vet Med Assoc*, 220: 1034-8.

Doolittle RF, Goldbaum DM, Doolittle LR. (1978). Designation of sequences involved in the "coiled-coil" interdomainal connections in fibrinogen: constructions of an atomic scale model. *J Mol Biol*, 120: 311–325.

Dunkel B, Chan DL, Boston R, et al. (2010) Association between hypercoagulability and decreased survival in horses with ischemic or inflammatory gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med*, 24(6):1467-74.

Ebinger T, Ruland A, Lakner M, et al. (2010). Validity, regulatory registration and approval of ROTEM thromboelastometry. *Blood coagulation & fibrinolysis*, 21: 106-107.

Edwards RL, Rickles FR. (1984). Macrophage procoagulants. *Prog Hemost Thromb*, 7: 183–209.

El Kady N, Khedr H, Yosry M, et al. (2009). Perioperative assessment of coagulation in paediatric neurosurgical patients using thromboelastography, *European journal of anaesthesiology*, 26: 293-297.

Epstein KL, Brainard BM, Lopes MA, et al. (2009). Thrombelastography in 26 healthy horses with and without activation by recombinant human tissue factor. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 19: 96-101.

Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. (1982). Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem*, 257(2): 859–864.

Feige K, Kastner SB, Dempfle CE, et al. (2003). Changes in coagulation and markers of fibrinolysis in horses undergoing colic surgery. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 50: 30-6.

Ferry JD. (1952). The mechanism of polymerization of fibrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 38: 566.

Folk JE, Finlayson JS. (1977). The epsilon-(gamma-glutamyl) lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem*, 31: 1–133.

Francis CW, Marder VJ, Martin SE. (1980). Plasmic degradation of crosslinked fibrin. Structural analysis of the particulate clot and identification of new macromolecular-soluble complexes. *Blood*, 56(3): 456–464.

Francis CW, Markham RE, Barlow GH, et al. (1983). Thrombin activity of fibrin thrombi and soluble plasmic derivatives. *J Lab Clin Med*, 102(2): 220–230.

Fukudome K, Esmon CT. (1994). Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem*, 269: 26486–26491.

George JN. (2000). Platelets. *Lancet*, 355: 1531–1539.

Griguer P. (1956). Thromboelastography in diagnosis and controlled treatment of hemophilia. *Alger Medicale*, 60: 619-25.

Hack EC. (2000) Tissue Factor pathway of coagulation in sepsis. *Critical Care Medicine*, 28: S25–30.

Halbmayer WM, Mannhalter C, Feichtinger C, et al. (1992). The prevalence of factor XII deficiency in 103 orally anticoagulated outpatients suffering from recurrent venous and/or arterial thromboembolism. *Thromb Haemost*, 68: 285–290.

Hartert H. (1951). Thrombelastography, a method for physical analysis of blood coagulation. *Z Gesamte Exp Med*, 117: 189-203.

Hartert H. (1948). Blutgerinnungsstudien mit der thrombelastographie, einem neuen untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr*, 26: 577-583.

Haslam RJ, Davidson MM, Fox JE, et al. (1978). Cyclic nucleotides in platelet function. *Thromb Haemost*, 40(2): 232–240.

Hermans J, McDonagh J. (1982). Fibrin: structure and interactions. *Semin Thromb Hemost*, 8(1): 11–24.

Hynes RO. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48(4): 549–554.

Innerhofer P, Streif W, Kuhbacher G, et al. (2004). Monitoring of Perioperative Dilutional Coagulopathy Using the ROTEM Analyzer: Basic Principles and Clinical Examples. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS*, 39: 739-744.

Iselin BM, Willmann PF, Seifert B, et al. (2001). Isolated reduction of haematocrit does not compromise in vitro blood coagulation. *British journal of anaesthesia*, 87: 246-249.

Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, et al. (1977). Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis*, 115(3): 461–478.

Jensen, R. (1999). Antiplatelets agents and platelets function analyzers. *Clinical hemostasis review*, 13: 1-3.

Johansson PI, Stensballe J, Vindelov N, et al. (2010). Hypocoagulability, as evaluated by thrombelastography, at admission to the ICU is associated with increased 30-day mortality, *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 21: 168-174.

Johansson PI, Stissing T, Bochsén L, et al. (2009). Thrombelastography and tromboelastometry in assessing coagulopathy in trauma. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*, 23; 17:45.

Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, et al. (1979). Platelet alpha-granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood*, 53(4): 604–618.

Kashuk JL and Moore EE. (2009). The emerging role of rapid thromboelastography in trauma care, *The Journal of trauma*, 67: 417-418.

Kashuk JL, Moore EE, Sabel A, et al. (2009). Rapid thrombelastography (r-TEG) identifies hypercoagulability and predicts thromboembolic events in surgical patients. *Surgery*, 146: 764-72; discussion 772-4.

Kaushansky K. (1998). Thrombopoietin. *N Engl J Med*, 339(11):746–754.

Keck G and Sternlicht Y. (1966). On the use of the thrombelastograph in veterinary medicine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 79: 21-5.

Kiczak J, Szozda M, and Wichert K. (1965). Value of trombelastography in the diagnosis of defects of hemostasis in children. *Pediatr Pol*, 40: 1193-200.

Kitchens CS. (1982). The anatomical basis of purpura. *Prog Hemost Thromb*, 5: 211–210.

Kol A, Borjesson DL. (2010). Application of thromboelastography / thromboelastometry to veterinary medicine. *Vet Clin Pathol*, 39(4): 405-416.

Kopec M, Teisseyre E, Dudek-Wojciechowska G. (1973). Studies on “Double D” fragment from stabilized bovine fibrin. *Thromb Res*, 2: 283–280.

Kraft W. (1973). Das thrombelastogramm der gesunden hauskatze und die behandlung der verbrauchskoagulopathie bei panleukopenie. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 20: 394-396.

Lam SC, Plow EF, D'Souza SE, et al. (1989). Isolation and characterization of a plateletmembrane protein related to the vitronectin receptor. *J Biol Chem*, 264(7): 3742–3749.

Leclere M, Lavoie JP, Dunn M, et al. (2009). Evaluation of a modified thrombelastography assay initiated with recombinant human tissue factor in clinically healthy horses. *Vet Clin Pathol*, 38: 462-466.



LeRoy EC, Ager A, Gordon JL. (1984) Effects of neutrophil elastase and other proteases on porcine aortic endothelial prostaglandin I<sub>2</sub> production, adenine nucleotide release, and responses to vasoactive agents. *J Clin Invest*, 74: 1003–1010.

Levi M and Schultz M. (2010). Coagulopathy and platelet disorders in critically ill patients. *Minerva anestesiologica*, 76(10): 851-9.

Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. (2001). Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 413(6855): 488–494.

Li T, Chang CY, Jin DY, et al. (2004). Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*, 427(6974): 541–544.

Lijnen HR, Hoylaerts M, Collen D. (1980). Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. Role in the regulation of fibrinolysis and identification as histidinerich glycoprotein. *J Biol Chem*, 255(21): 10214–10222.

MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM, et al. (1989). Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(18): 7285–7289.

MacGregor RR, Friedman HM, Macarak EJ, et al. (1980). Virus infection of endothelial cells increases granulocyte adherence. *J Clin Invest*, 65(6): 1469–1477.

Macieira S, Rivard GE, Champagne J, et al. (2007). Glanzmann thrombasthenia in an Oldenbourg filly. *Vet Clin Pathol*, 36: 204-8.

MacLeod JB, Lynn M, McKenney MG, et al. (2003). Early coagulopathy predicts mortality in trauma. *The Journal of trauma*, 55: 39-44.

Mandle R Jr, Colman RW, Kaplan AP. (1976). Identification of prekallikrein and high molecular weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 4179–4183.

Mao SJ, Tucci MA. (1990). Lipoprotein(a) enhances plasma clot lysis in vitro. *FEBS Lett*, 267: 131–134.

Marcus AJ, Weksler BB, Jaffe EA. (1978). Enzymatic conversion of prostaglandinendoperoxide H<sub>2</sub> and arachidonic acid to prostacyclin by cultured humanendothelial cells. *J Biol Chem*, 253(20): 7138–7141.

Marder V, Colman RW, Francis CW. (1993). Consumptive thrombohemorrhagic disorders. In: Hirsh J, Marder V, Salzman E, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*, 3rd ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott

McDonagh J, Carrell N. (1993). Dysfibrinogens and other disorders of fibrinogen structure and function. In: Hirsh J, Marder V, Salzman E, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*, 3rd ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott Co.

McKee PA, Mattock P, Hill RL. (1970). Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin, and cross-linked insoluble fibrin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 66(3): 738–744.

Mielke CH. (1984). International committee communications: Measurement of the bleeding time. *Thromb Hemostas*, 52: 210-211.

Mikkola HK, Klintman J, Yang H, et al. (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stemcell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*, 421(6922): 547–551.

Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW. (1978). Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *J Biol Chem*, 253(19):6908–6916.

Moalic P, Gruel Y, Foloppe P, et al. (1989). Hemostasis development in the lamb fetus and neonate. *Am J Vet Res*, 50: 59-63.

Moganasundram S, Hunt BJ, Sykes K, et al. (2010). The relationship among thromboelastography, hemostatic variables, and bleeding after cardiopulmonary bypass surgery in children, *Anesthesia and Analgesia*, 110: 995-1002.

Moncada S, Vane JR. (1979). The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc*, 38(1): 66–71.

Monreal L, Angles A, Espada Y, et al. (2000). Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Vet J Suppl*, 32: 19-25.

Mosher DF. (1976). Action of fibrin-stabilizing factor on cold-insoluble globulin and alpha2-macroglobulin in clotting plasma. *J Biol Chem*, 251(6): 1639–1645.

Nachmias V, Sullender J, Asch A. (1977). Shape and cytoplasmic filaments in control and lidocaine-treated human platelets. *Blood*, 50(1): 39–53.

Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, et al. (1998). Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell*, 93(1): 61–70.

Ofosu FA, Buchanan MR, Anvari N, et al. (1989). Heparin, heparan sulfate and dermatan sulfate. *Ann N Y Acad Sci*, 556: 123.

Paltrinieri S, Meazza C, Giordano A, et al. (2008). Validation of thromboelastometry in horses. *Vet Clin Pathol*, 37: 277-85.

Parsipanny NJ. (1991). *Thrombin Prest: Calcium Thrombin for the Determination of the Thrombin Time*. American Bioproducts Company.

Petersen H, Breddin K, Rottger K. (1954). Performance of thrombelastography in clinical studies. *Klin Wochenschr*, 32: 328-9.

Plow EF. (1982). Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. *J Clin Invest*, 69(3): 564–572.

Powner DJ (2010). Thromboelastography during adult donor care, *Progress in transplantation*, 20: 163-7; quiz 168.

Prasse KW, Allen, Jr, Moore JN, et al. (1990). Evaluation of coagulation and fibrinolysis during the prodromal stages of carbohydrate-induced acute laminitis in horses. *Am J Vet Res*, 51: 1950-5.

Preisman S, Kogan A, Itzkovsky K, et al. (2010). Modified thromboelastography evaluation of platelet dysfunction in patients undergoing coronary artery surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 37: 1367-1374.

Proctor RR, Rapaport SI. (1961). The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *American Journal of Clinical Pathology*, 36: 212-219.

Pickett WC, Jesse RL, Cohen P. (1976). Initiation of phospholipase A2 activity in human platelets by the calcium ion ionophore A23187. *Biochim Biophys Acta* 486(1): 209–213.

Rao LV, Rapaport SI. (1987). Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation. *Blood*, 69: 645–651.

Rapaport RM, Murad F. (1983). Endothelium-dependent and nitrovasodilator induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*, 9(4-5): 281–296.

Robbins KC. (1944). A study on the conversion of fibrinogen to fibrin. *Am J Physiol*, 142: 581–580.

Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E. (1999). Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*, 94(1): 172–178.

Ruoslahti E, Pekkala A, Engvall E. (1979). Effect of dextran sulfate on fibronectin-collagen interaction. *FEBS Lett*, 107(1): 51–54.

Rutherford NJ. (1995). *Unopette. WBC/Platelets determination for Manual Methods*. Becton, Dickinson, and Company; New Jersey.

Samama CM (2001). Thromboelastography: the next step, *Anesthesia and Analgesia*, 92: 563-564.

Santoro SA and Evy CS. (2000). Laboratory evaluation of hemostatic disorders. In: *Hematology: Basic principles and procedures*. 3rd Edition. Churchill Livingstone." 1841-50.

Schött U, Nilsson LG, Broman M, et al. (2010) Monitoring of low molecular weight heparin anticoagulant during haemodialysis with a Sonoclot Analyzer. *Perfusion*, 25(4): 191-6.

Scott CF, Silver LD, Purdon AD, et al. (1985). Cleavage of human high molecular weight kininogen by factor XIa in vitro. Effect on structure and function. *J Biol Chem*, 260: 10856–10863.

Segura D, Monreal L, Espada Y, et al. (2005) Assessment of a platelet function analyzer in horses: reference range and influence of a platelet aggregation inhibitor. *Vet J*, 170(1): 108-12.

Segura D and Monreal L. (2008). Poor reproducibility of template bleeding time in horses, *J Vet Intern Med*, 22: 238-41.

Serikova AZ and Makhalova OK. (1965). Changes in blood coagulation in dogs in acute radiation disease according to thrombelastography data. *Radiobiologija*, 5: 473-6.

Shapiro S, Sherwin B, Gordimer H. (1942). Postoperative Thrombo-Embolization: the Platelet Count and the Prothrombin Time After Surgical Operations: a Simple Method for Detecting Reductions and Elevations of the Prothrombin Concentration (Or Activity) of the Blood Plasm. *Annals of Surgery*, 116: 175-183.

Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, et al. (1973). Human factor XIII from plasma and platelets. Molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and crosslinking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem*, 248: 1395–1407.

Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, et al. (1986). Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp—specific adhesion receptors. *Science*, 231(4745): 1559–1562.

Sharma P, Saxena R. (2010). A novel thromboelastographic score to identify overt disseminated intravascular coagulation resulting in a hypocoagulable state. *American Journal of Clinical Pathology*, 134: 97-102.

Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, et al. (1985). Changes in the platelet membraneglycoprotein IIb.IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*, 260(20): 11107–11114.

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. (1998). Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*, 91(8): 2645–2657.

Sivula M, Pettila V, Niemi TT, et al. (2009). Thromboelastometry in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation, *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 20 419-426.

Soares AD, Parreira F. (1958). Thromboelastography applied to the study of coagulation in liver diseases. *J Med (Oporto)*, 35: 705-6.

Stokol T, Erb HN, De Wilde L, et al. (2005). Evaluation of latex agglutination kits for detection of fibrin(ogen) degradation products and D-dimer in healthy horses and horses with severe colic, *Vet Clin Pathol*, 34: 375-82.

Vilar P, Couto CG, Westendorf N, et al. (2008). Thromboelastographic tracings in retired racing greyhounds and in non-greyhound dogs. *J Vet Intern Med*, 22: 374-9.

Villanova PA. (1994). Procedure for the Determination of Fibrinogen in Plasma, H30-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Wagner DD, Urban-Pickering M, Marder VJ. (1984). Von Willebrand protein binds to extracellular matrices independently of collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(2): 471–475.

Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, et al. (1989). Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol*, 13(Suppl. 5): S85–S88; discussion S102.

Wasowicz M, McCluskey SA, Wijeyesundera DN, et al. (2010). The incremental value of thrombelastography for prediction of excessive blood loss after cardiac surgery: an observational study. *Anesthesia and Analgesia*, 111: 331-338.

Wasowicz M, Meineri M, McCluskey SM, et al. (2009). The utility of thromboelastography for guiding recombinant activated factor VII therapy for refractory hemorrhage after cardiac surgery. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 23: 828-834.

Weiss HJ, Turitto VT. (1979). Prostacyclin (prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood*, 53(2): 244–250.

Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. (1977). Synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub>(prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(9): 3922–3926.

Welch RD, Watkins JP, Taylor TS, et al. (1992). Disseminated intravascular coagulation associated with colic in 23 horses (1984-1989). *J Vet Intern Med*, 6: 29-35.

Welles EG, Prasse KW, Duncan A, et al. (1990). Antigenic assay for protein C determination in horses. *Am J Vet Res*, 51: 1075-9.

Wiinberg B, Jensen AL, Johansson PI, et al. (2008). Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *J Vet Intern Med*, 22: 357-65.

Wiinberg B, Jensen AL, Rojkjaer R, et al. (2005). "Validation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs", *Vet Clin Pathol*, 34: 389-93.

Wiman B, Chmielewska J, Ranby M. (1984). Inactivation of tissue plasminogen activator in plasma. Demonstration of a complex with a new rapid inhibitor. *J Biol Chem*, 259(6): 3644–3647.



## Bibliografía

---