

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL Y  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**TESIS DOCTORAL**

**APORTACIÓN AL ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA  
EN PERROS CON CÁNCER**

**ENRIQUE RODRÍGUEZ GRAU - BASSAS**

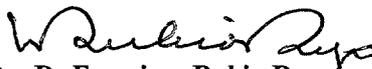
Las Palmas de Gran Canaria, Febrero de 1998

45/1997-98

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO**

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE (SUOTOS)  
Las Palmas de Gran Canaria a 23 de abril de 1998.



El/a Presidente/a: Dr. D. Francisco Rubio Royo,



El/a Secretario/a: Dr. D. Fernando Real Valcárcel,



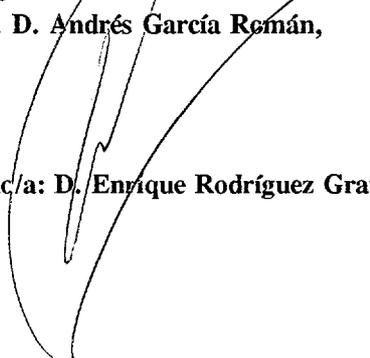
El/a Vocal: Dr. D. Manuel Rodríguez Sánchez,



El/a Vocal: Dr. D. Antonio Fernández Rodríguez,



El/a Vocal: Dr. D. Andrés García Román,



El/a Doctorandc/a: D. Enrique Rodríguez Grau-Bassas,

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN  
ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

APORTACIÓN AL ESTUDIO DE LA  
AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS  
CON CÁNCER

J. ENRIQUE RODRÍGUEZ GRAU-BASSAS.

Las Palmas de Gran Canaria, 1998.



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
LAS PALMAS DE G. CANARIA	
N.º Documento	536.848
N.º Copia	536.855

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
FACULTAD DE VETERINARIA

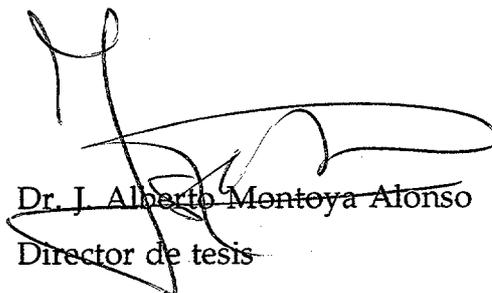
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN  
ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

APORTACIÓN AL ESTUDIO DE LA  
AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS  
CON CÁNCER

Tesis Doctoral presentada por D. J. Enrique Rodríguez Grau-Bassas.



Dr. C. Guillermo Couto  
Director de tesis



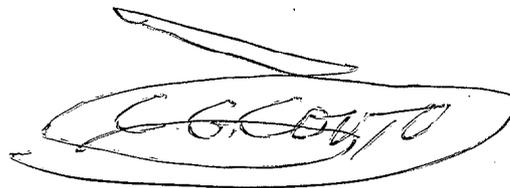
Dr. J. Alberto Montoya Alonso  
Director de tesis

C. GUILLERMO COUTO, PROFESOR Y JEFE DEL SERVICIO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DEL ESTADO DE OHIO (E.E. U.U.)

INFORMA:

Que Don J. Enrique Rodríguez Grau-Bassas, licenciado en Veterinaria. ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo, titulado: **"APORTACIÓN AL ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON CÁNCER"**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica suficientes para su presentación con el fin de optar al grado de Doctor en Veterinaria.

En Las Palmas de Gran Canaria a 23 de febrero de 1998

A handwritten signature in black ink, enclosed within a large, hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to read 'C. GUILLERMO COUTO'.

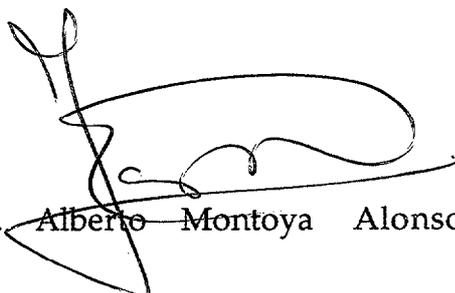
C. Guillermo Couto.

J. ALBERTO MONTOYA ALONSO, CATEDRÁTICO DEL  
ÁREA DE CONOCIMIENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL DEL  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN  
ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS DE LA U.L.P.G.C.

INFORMA:

Que Don J. Enrique Rodríguez Grau-Bassas, licenciado en Veterinaria.  
ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo, titulado:  
**“APORTACIÓN AL ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN  
PLAQUETARIA EN PERROS CON CÁNCER”**, el cual considero  
reúne las condiciones y calidad científica suficientes para su presentación  
con el fin de optar al grado de Doctor en Veterinaria.

En Las Palmas de Gran Canaria a 23 de febrero de 1998



J. Alberto Montoya Alonso.

A mis padres

A mis hermanos

## ÍNDICE

<u>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</u> .....	1
1. 1.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	2
1. 2.- OBJETIVOS.....	5
<u>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	6
2. 1.- LA PLAQUETA: MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN.....	7
2. 1. 1.- Mecanismos de adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria.....	10
2. 1. 2.- Receptores plaquetarios.....	12
2. 2.- MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD PLAQUETARIA. ....	19
2. 2. 1.- Pruebas "in vivo". ....	19
2. 2. 2.- Agregación plaquetaria "in vitro". ....	19
A.- Método de impedancia. ....	19
B.- Método turbidimétrico. ....	19
C.- Citometría de flujo. ....	20
D.- Marcadores de activación plaquetaria. ....	20
2. 3.- PLAQUETAS Y ENFERMEDAD. ....	22
2. 3. 1.- Cáncer y funcionalidad plaquetaria.....	22
A.- Enfermedad tromboembólica.....	22
B.- Alteraciones cuantitativas de las plaquetas.....	24
a) Trombocitopenias.....	24
b) Trombocitosis y trombemias. ....	26
C.- Alteraciones cualitativas de las plaquetas. ....	27
a) Cuadros neoplásicos asociados a función plaquetaria disminuida.....	27
b) Trombocitopatías congénitas del perro. ....	28

2. 3. 2.- Plaquetas y metástasis. ....	28
2. 3. 3.- Plaquetas e inflamación. ....	32
2. 3. 4.- Trombocitopenias inmuno-mediadas y actividad plaquetaria.....	34
2. 3. 5.- Ehrlichiosis caninas y función plaquetaria. ....	38
2. 3. 6.- Estados urémicos y función plaquetaria. ....	39
2. 4.- EFECTOS DE LA VINCRISTINA SOBRE NÚMERO Y FUNCIÓN PLAQUETARIA. ....	40
2. 4. 1.- Efectos cuantitativos de la vincristina sobre las plaquetas.....	40
2. 4. 2.- Efectos cualitativos de la vincristina en la funcionalidad plaquetaria.....	42
<u>3.- MATERIAL Y MÉTODOS.</u> .....	44
3. 1.- SELECCIÓN DE PACIENTES.....	46
3. 2.- MATERIAL Y METODOLOGÍA EMPLEADOS ( GRUPOS 1, 2 Y 3).....	52
a) Toma de muestras. ....	52
b) Obtención de plasma rico en plaquetas. ....	52
c) Obtención de plasma pobre en plaquetas. ....	52
d) Recuento plaquetario. ....	52
e) Método de agregación plaquetaria. ....	52
f) Parámetros estudiados. ....	53
3. 3.- MATERIAL Y METODOLOGÍA ESPECÍFICOS DEL GRUPO 4.....	54
3. 4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO ....	55
3. 4. 1.- Grupos 1, 2 y 3. ....	55
3. 4. 2.- Grupo 4. ....	55
<u>4.- RESULTADOS.</u> ....	56
4. 1.-RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS GRUPOS 1, 2 Y 3.....	57
4. 1. 1.- Agregación máxima. ....	59

4. 1. 2.- Pendiente. ....	59
4. 1. 3.- Tiempo hasta la mitad la agregación máxima.....	60
4. 2.- RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL GRUPO 4. ....	62
4. 2. 1.- Agregación máxima. ....	63
4. 2. 2.- Pendiente. ....	64
4. 2. 3.- Tiempo hasta la mitad la agregación máxima. ....	64
4. 2. 4.- Recuentos plaquetarios. ....	65
Tablas.....	66
<u>5.- DISCUSIÓN.</u> .....	86
5. 1.- IDONEIDAD DEL MÉTODO. ....	87
5. 2.- AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON INFLAMACIÓN CRÓNICA.....	88
5. 3.- AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON NEOPLASIAS MALIGNAS. ....	90
5. 4.- COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS 2 Y 3.....	92
5. 5.- EFECTOS DE LA VINCRISTINA SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON NEOPLASIAS MALIGNAS.....	93
<u>6.-</u> <u>CONCLUSIONES.</u> .....	97
<u>7.- RESUMEN.</u> ....	99
<u>8.- SUMMARY.</u> .....	101
<u>9.- AGRADECIMIENTOS.</u> ....	103
<u>10.- BIBLIOGRAFÍA.</u> ....	106

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

1/2 T Ag Max: Mitad del tiempo transcurrido hasta la agregación máxima.

AA: Ácido araquidónico.

AAP: Anticuerpos antiplaquetas.

ADP: Adenosín difosfato.

Ag Max: Agregación máxima expresada en tantos por ciento.

AMP-c: Adenosín-monofosfato cíclico.

APICT: Agregación plaquetaria inducida por células tumorales.

COL: Colágeno.

HVD: Hospital Veterinario Docente.

MC: Megacariocito.

NK: Células asesinas, natural killers

PIT: Púrpura idiopática trombocitopénica.

PPP: Plasma pobre en plaquetas.

PRP: Plasma rico en plaquetas.

rpm: Revoluciones por minuto.

SC: Sangre completa.

SCA: Sistema canalicular abierto

SMF: Sistema mononuclear fagocítico.

STD: Sistema tubular denso

TIM: Trombocitopenia inmuno mediada.

TxA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>.

UEO: Universidad del Estado de Ohio.

VCR: Vincristina.

# 1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

## 1. 1.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La incidencia de anomalías hemostáticas asociadas a neoplasias malignas es muy elevada tanto en el perro como en el hombre. En el primer caso, los cuadros tromboembólicos, de coagulación intravascular diseminada, o hemorrágicos son una frecuente complicación de los pacientes caninos con cáncer y en ocasiones la causa directa de la muerte o eutanasia del animal. En el perro, el periodo comprendido entre el diagnóstico de la enfermedad maligna y la muerte del animal es generalmente más corto que en el humano, debido frecuentemente a la eutanasia, siendo esta una de las posibles causas de que la incidencia de manifestaciones clínicas sea menor en aquella especie. Las manifestaciones histopatológicas son también menos notorias debido al menor número de estudios post-mortem. Sin embargo, tanto unas como otras se presentan con notable frecuencia en la clínica canina (Madewell et al., 1980; Couto, 1984; O'Keefe y Couto, 1988).

Otro fenómeno íntimamente relacionado con la actividad y número de plaquetas es la incidencia de metástasis. En 1963, Gassic y colaboradores demostraron en animales de experimentación que aquellos individuos con trombocitopenias inducidas presentaban una drástica reducción en la presentación de metástasis tras la inyección de células tumorales. En años sucesivos éste y otros autores demostraron que con solo atenuar la agregabilidad plaquetaria se obtenían los mismos resultados. Así, la administración de prostaciclina o sus derivados a roedores de laboratorio en los que se inducían metástasis experimentalmente, ha dado lugar a espectaculares reducciones en la incidencia de las mismas, a veces hasta del 94 % (Honn et al., 1981, 1986; Schneider et al, 1994). Paralelamente, varios grupos investigadores han notificado hiperagregabilidad en pacientes humanos y caninos con cáncer debido a la actividad agregante plaquetaria de ciertas células tumorales (Tanaka et al, 1986). Recientemente, un grupo de

## Introducción y objetivos.

investigadores ha encontrado hiperagregabilidad plaquetaria en un conjunto de perros afectados de variadas neoplasias malignas, sin atender al tipo histológico, y postula que dicho fenómeno pueda ser total o parcialmente debido a la cronicidad del proceso (McNiel et al, 1997). Por otra parte, es también conocido que la actividad trombogénica de diversos tipos de células tumorales está directamente relacionada con el tipo histológico de tumor (Gassic et al, 1976).

Otras enfermedades no neoplásicas se han relacionado con una función plaquetaria anormal en el perro y el hombre ( Schaffer, 1985; Di DiMino et al, 1985; et al, 1989; Willis et al, 1989). En los últimos años, las plaquetas han sido incluidas entre las células inflamatorias y se han realizado numerosos estudios, principalmente en relación a los gránulos y moléculas de superficie plaquetarios, que ponen de manifiesto su importante papel en el contexto de las células inflamatorias.

La familia de las selectinas, importante grupo de moléculas de adhesión entre las que destaca la P-selectina, se ha revelado como decisiva en la respuesta inflamatoria leucocítica (Furie y Furie, 1996). La existencia de plaquetas activadas en diversos procesos inflamatorios, como el síndrome de distrés respiratorio, la enfermedad inflamatoria intestinal crónica, etc., está ampliamente documentada, así como el papel de estas células sanguíneas en dichos procesos (Mannaioni et al., 1997).

Hasta el momento son muy escasos los estudios comparativos entre la actividad plaquetaria de pacientes caninos o humanos con neoplasias no tratadas y pacientes con cuadros inflamatorios crónicos no tratados, con objeto de comprobar si la presencia de la inflamación crónica "per se" es también capaz de inducir cambios en la citada actividad plaquetaria, en un intento de evidenciar la influencia del cuadro inflamatorio asociado a muchos de los procesos neoplásicos.

## Introducción y objetivos.

Por último, la actividad y número plaquetario son dos factores que se ven afectados por el empleo de vincristina, un alcaloide de la *Catharanthus roseus* G Don (antes *Vinca rosacea* Linn.) frecuentemente empleado como agente quimioterápico en el tratamiento de diversas neoplasias y en el de las trombocitopenias inmuno-mediadas, en este último caso como protrombocítico (Yeon, 1974; Green et al., 1982) o estimulador de la megacariocitopoyesis (Jackson y Edwards, 1977). Los alcaloides de la Vinca ejercen su acción como agentes antimicrotubulares y como tales se les clasifica. Siendo los microtúbulos una estructura muy abundante en el citoesqueleto de la plaqueta, es lógico pensar que el empleo de este compuesto en un paciente trombocitopénico pueda producir alteraciones en la morfología y actividad plaquetaria (Steinhertz, 1976, Bee, 1980; Stenberg et al, 1995).

Creemos necesario comparar la actividad plaquetaria antes y después de la administración de vincristina a dosis terapéuticas en pacientes reales, con el fin de evaluar potenciales alteraciones plaquetarias funcionales, de gran interés en pacientes caninos y humanos con trombocitopenias inmuno-mediadas, e indirectamente su potencial efecto inhibitor o modulador en el establecimiento y desarrollo de metástasis.

En el Hospital Veterinario Docente de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad del Estado de Ohio (Estados Unidos de América) se vienen desarrollando varias líneas de investigación sobre cáncer, tanto dentro de la Unidad de Oncología y Hematología, dirigida por el Profesor Couto y perteneciente al Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, como en cooperación con el Departamento de Biociencias de la misma Facultad o el Hospital de Cáncer e Instituto de Investigación Arthur G. James, también perteneciente a la Universidad de Ohio. Este trabajo se ha encuadrado dentro de una serie de investigaciones que se iniciaron hace varios años, dirigidas por el citado Profesor Couto y el Profesor Gary Kociba, este último del Departamento de Biociencias.

## Introducción y objetivos.

### 1. 2.- OBJETIVOS

1.- Determinar los efectos de la inflamación crónica sobre la agregación plaquetaria del perro.

2.- Estudiar la agregación plaquetaria en perros con neoplasias malignas.

3.- Realizar un estudio comparativo sobre la actividad plaquetaria en ambos procesos patológicos.

4.- Evaluar el efecto de la vincristina a dosis terapéuticas sobre la funcionalidad plaquetaria de perros con cáncer.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 2. 1.- LA PLAQUETA: MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN.

Las plaquetas o trombocitos son células sanguíneas derivadas de los megacariocitos (MC) de la médula ósea y otros tejidos extramedulares. Sobre ambos tipos celulares actúan sistemas reguladores que intervienen tanto en el desarrollo de las progenitoras como en la diferenciación final, si bien la mayoría de la información disponible a este respecto procede de modelos experimentales murinos (Gerwitz y Schick, 1994).

En las últimas décadas se han producido importantes avances en el conocimiento de las plaquetas y su interacción con las paredes vasculares dentro de su papel fundamental en la coagulación sanguínea (White, 1971). Además de estas funciones, las plaquetas participan en el proceso inflamatorio y de reparación tisular que acontece a continuación del daño endotelial. Con este fin, estas pequeñas células sanguíneas colaboran estrechamente con los diversos tipos de leucocitos. Las plaquetas activadas segregan sustancias quimiotácticas que facilitan la unión de los leucocitos al endotelio vascular y su posterior extravasación, y participan en la estimulación o inhibición de la respuesta inflamatoria de los leucocitos. Por otra parte, los trombocitos disponen de una variada gama de potentes sustancias proinflamatorias, lo que permite considerarlas como células mediadoras y efectoras en la inflamación. Su capacidad de interactuar con bacterias, parásitos y otros elementos extraños es posiblemente un vestigio filogenético que explica la presencia de mecanismos destructores dependientes de Ig E en éstas células (Klinger, 1997).

Giulio Bizzozero en 1882 fue el primero en caracterizar su participación funcional en la coagulación sanguínea y Ramón y Cajal, en 1896, quien detectó su capacidad fagocítica. Esta actividad coaguladora fue la única atribuida a las plaquetas durante más de 50 años, y es a partir de la década de los 60 cuando se las relaciona con procesos de defensa contra infecciones y en reacciones inflamatorias (White, 1971). Desde finales de los 80 se ha aceptado de forma generalizada su papel mediador y efector en la

inflamación, especialmente a partir de los descubrimientos más recientes en relación al contenido de sus gránulos de almacenamiento, y han pasado de mero "cemento reparador" de lesiones endoteliales vasculares a ser consideradas como un importante y activo miembro del "entramado inflamatorio intercelular" (Klinger, 1997).

Los trombocitos en sangre completa (SC) o en suspensión de plasma rico en plaquetas (PRP) presentan una típica morfología discoide biconvexa, en cuya superficie pueden apreciarse indentaciones correspondientes a aberturas de comunicación con el exterior de la célula a través del sistema de canalículos abiertos (SCA). Con la finalidad de simplificar su compleja estructura y correlacionarla fisiológica y bioquímicamente con los aspectos tratados en nuestro estudio, dividiremos a esta célula en las cuatro zonas propuestas por White (White, 1971, 1994).

En primer lugar la **zona periférica** incluye a su vez tres dominios estructurales: la cubierta externa, la unidad de membrana y la región submembranosa.

La cubierta externa o glucocálix es rica en glucoproteínas, muchas de las cuales actúan como receptores de diversos agonistas y participan tanto en los procesos de adhesión como de agregación, funciones de las que nos ocuparemos más adelante.

La unidad de membrana no presenta variaciones destacables con respecto a la membrana de otros elementos formes, si bien se le atribuye una importancia crítica en el proceso de la homeostasis.

La región submembranosa forma una "barrera" que en condiciones normales no presenta organoides citoplasmáticos, compuesta por filamentos cortos de actina que, según algunos investigadores, intervienen en el mantenimiento de la forma discoide y en la emisión de pseudópodos (Schollmeyer et al, 1978). Otros investigadores sugieren que estos filamentos se interconectan con las porciones transmembranosas de los receptores de

membrana y generan la fuerza necesaria para moverlos una vez unidos a sus ligandos específicos (White et al, 1990).

En segundo lugar la **zona de sol-gel** constituye la matriz o citoesqueleto de la plaqueta, que está formada por tres tipos de fibras: los subfilamentos de membrana, los microfilamentos y los microtúbulos circulares. Estos últimos son los de mayor importancia y se encuentran formando grupos de 8 a 24 con un perfil circular, en los extremos polares de la célula lentiforme. Su función durante la adhesión y agregación plaquetaria es controvertida (White, 1994).

En tercer lugar la **zona de organoides citoplasmáticos**, en la que cabe destacar la presencia de dos tipos de gránulos. Los gránulos alfa son unas singulares organelas secretoras que a su vez presentan compartimentación y que adquieren su contenido proteico por dos mecanismos diferentes: Biosíntesis a nivel predominantemente megacariocítico y vestigial a nivel plaquetario, y por endocitosis y pinocitosis tanto a nivel de MC como de plaqueta circulante.

La relación de sustancias alfa-granulares continua aumentando e incluye diversas proteínas adhesivas, como factor von Willebrand (FvW) fibrinógeno y trombospondina, proteínas plasmáticas como Ig G y albúmina, mitógenos celulares como beta-tromboglobulina y factor plaquetario 4, factores de coagulación como factor V e inhibidores de proteasas como alfa 2-macroglobulina y alfa 2-antiplasmina. Más recientemente, en la capa interna de estos gránulos se ha demostrado la existencia de importantes receptores fisiológicos, incluyendo la glucoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) y la P-selectina (Harrison y Cramer, 1993). La carencia o escasez de estos gránulos determina el síndrome de la plaqueta gris.

En esta zona se encuentran además lisosomas, mitocondrias y cuerpos densos, probablemente depósitos de reservas no metabólicas de nucleótidos de adenina, serotonina, pirofosfato y calcio segregados por las plaquetas durante la reacción de liberación. Estos cuerpos densos están ausentes en enfermos con el síndrome de Hermansky-Pudlak, enfermedad de depósito

caracterizada por la agregación defectuosa "in vitro" y un cuadro clínico hemorrágico "in vivo" (White, 1994).

Por último, los **sistemas de membranas**: El sistema de canalículos abiertos (SCA), originado a partir de la membrana del megacariocito, lo constituyen una serie de invaginaciones tortuosas que a modo de túneles atraviesan el citoplasma, apreciables tanto en las células en reposo como activas. Son verdaderas "calles de dos vías", por su doble capacidad de endo y exocitosis, que participan en los procesos de liberación o secreción de sustancias almacenadas en los gránulos alfa, captación de sustancias plasmáticas a almacenar en dichos gránulos y vía de entrada de bacterias y otros patógenos fagocitados.

El sistema tubular denso (STD) es un residuo del retículo endoplásmico de la célula madre (MC). Es el organoide más importante en el metabolismo del ácido araquidónico (AA) y además parece desarrollar un importante papel en la estabilidad microtubular. Ambos sistemas tubulares presentan interconexiones a través de fenestraciones presentes en el SCA, a las cuales se conectan los canales del STD (White, 1971).

### **2. 1. 1.- Mecanismos de adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria.**

Al producirse una alteración del endotelio vascular, las plaquetas participan en la hemostasia a través de cuatro mecanismos básicos. La **adhesión** a la zona dañada es un mecanismo pasivo que conlleva la interacción de estas células con la matriz vascular subendotelial pero no con sustancias existentes en el plasma y que no requiere gasto energético para la plaqueta. Para que este proceso tenga lugar, parece necesaria la **activación** previa de las plaquetas, constituyendo así uno de los mecanismos reguladores que evitan la interrupción del flujo sanguíneo cuando el endotelio vascular no ha sido dañado. Esta **activación** es inducida por la actuación de diversos agonistas sobre receptores específicos de membrana,

los cuales a través de los llamados “mensajeros secundarios” transmiten las correspondientes señales a los efectores intracelulares (Bennet, 1992; Blockmans et al., 1995). También se ha sugerido que la adhesión plaquetaria preceda a la activación y sea al menos en parte responsable de esta (Ruggeri, 1993, 1994 ).

En respuesta a diversos estímulos activadores, las plaquetas pierden su morfología discoide y en pocos segundos desarrollan largos pseudópodos. Este cambio de forma viene acompañado por la notable secreción de sustancias adhesivas y proinflamatorias, en la también llamada reacción de liberación y activando el principal receptor para las proteínas adhesivas, la GPIIb/IIIa. Las plaquetas pueden ser activadas por diversos agonistas que interactúan con receptores específicos de su membrana plasmática. Estos receptores consisten en un solo polipéptido con un dominio terminal extracelular, siete dominios hidrófobos transmembranosos y un dominio intracelular C-terminal, en conexión con las enzimas encargadas de generar los mensajeros citoplasmáticos secundarios. El tromboxano  $A_2$  ( $TxA_2$ ) , sintetizado a partir del AA liberado en el proceso, la secreción del ADP y de otras sustancias como calcio, serotonina, factores plaquetarios 3 y 4, fibrinógeno plaquetario, enzimas proteolíticas y ATP, que son vertidos al exterior a través del SCA, potencian la acción de los agonistas (Hawiger, 1992, Blockmans et al., 1995).

Una vez activadas, las plaquetas adheridas a la zona dañada comienzan a interactuar con sustancias plasmáticas y con otras plaquetas, dando lugar al fenómeno de agregación. Para ello, las plaquetas también disponen de receptores más o menos específicos que se encuentran estructurados en las distintas glucoproteínas de la membrana celular, algunos de los cuales intervienen además en los dos eventos antes mencionados (Bennet, 1992).

### 2. 1. 2- Receptores plaquetarios.

La glucoproteína Ib/IX (GPIb/IX) es la de mayor importancia en el proceso de adhesión en condiciones de alto rozamiento. Es un heterodímero no covalente compuesto por la GPIb (pm =170.000) y la GPIX (pm=17.000). La primera de ellas, GPIb, es a su vez otro heterodímero formado por la GPIalfa y GPIβ, ligadas por un puente disulfuro. Cada uno de estos componentes es por si mismo una proteína integrante de la membrana, anclada en esta por un dominio transmembranoso. Todo el complejo está a su vez ligado al citoesqueleto de la plaqueta en reposo mediante una asociación proteica ligada a la actina. Cada plaqueta tiene unos 25.000 complejos GPI/IX. Todo esto se observa al microscopio electrónico como un cilindro flexible con dominios globosos en cada extremo y una longitud total de 60 nm (Bennet, 1992) (Fig. 1).

La glucoproteína Ib alfa contiene un amino-terminal con zonas de unión para el FvW y para la trombina. La GP Ibβ, codificada por un gen distinto al de la GP I-alfa, tiene un p.m. de 19.000 y al parecer es el substrato de la "proteín-quinasa" dependiente del AMP-c (Bennet, 1992).

La GP IX tiene un peso molecular de aproximadamente 17.000 y su función es aún desconocida. Ciertas anomalías congénitas en la GP Ib/IX son las responsables del síndrome de Bernard-Soulier, trastorno de la coagulación en humanos, que además cursa con trombocitopenia y plaquetas anormalmente grandes, que no aglutinan en presencia de ristocetina incluso después de añadir FvW normal (Bennet, 1992).

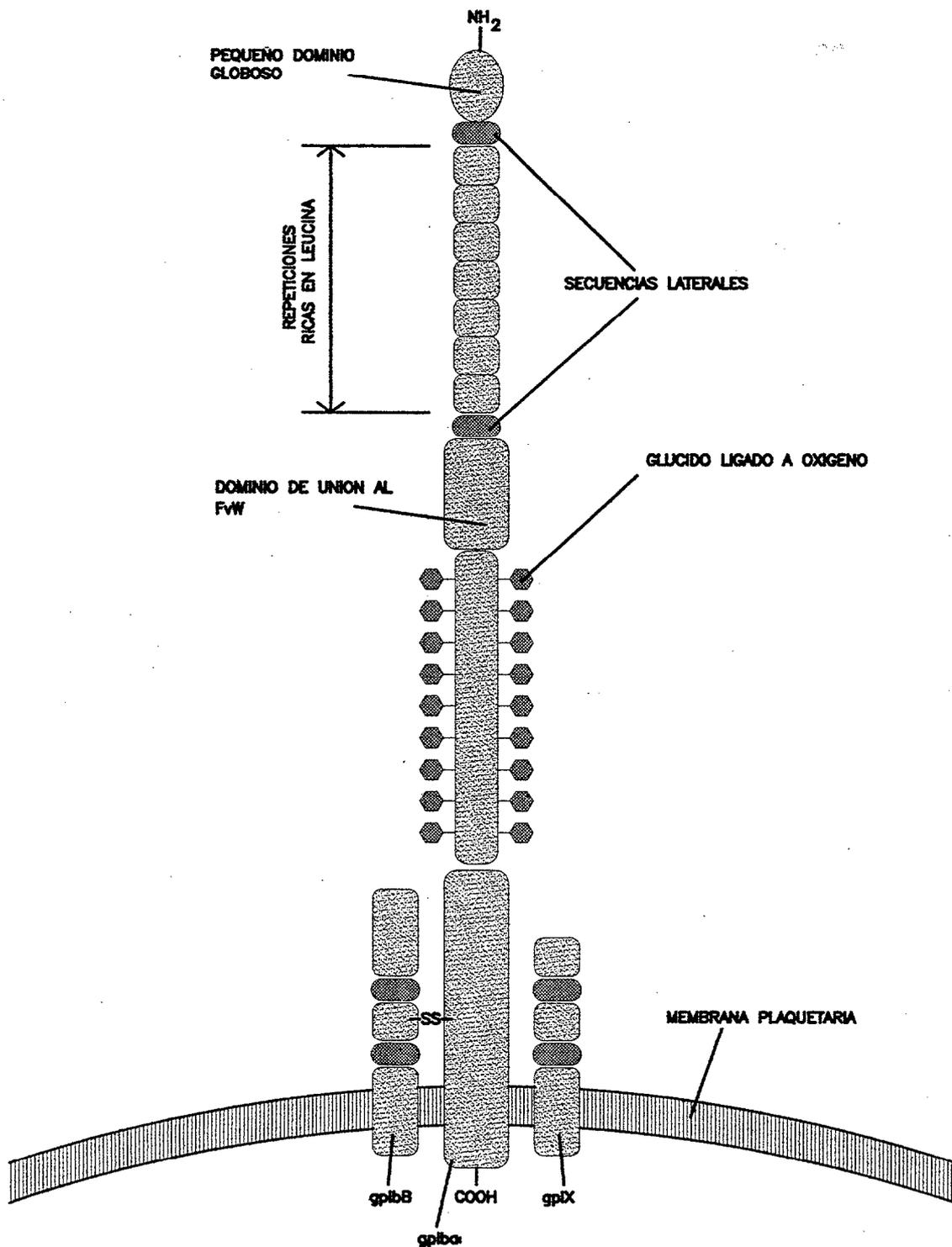


Fig 1. Esquema del complejo de adhesión GPIIb/IIIa, consistente en tres glucoproteínas ligadas a la membrana, en donde destaca morfológica y funcionalmente la subunidad alfa de la GPIIb (Adaptado de Bennet, 1992).

Este factor (FvW) se sintetiza en los megacariocitos y en las células endoteliales, y puede presentarse formando multímeros cuyo peso molecular oscila entre 500 y 10.000 kDa. Los mayores, que se encuentran en las plaquetas y en el endotelio vascular, y solo de forma transitoria en sangre normal, son los más eficaces a la hora de promover adhesión y agregación plaquetaria. Cuando en sangre se ligan a componentes subendoteliales, especialmente colágeno tipo IV, experimentan una transformación estructural que les permite unirse al receptor plaquetario GPIIb. Igualmente, las fuerzas de alto rozamiento antes mencionadas podrían inducir estos cambios estructurales (Ikeda et al., 1991; Ruggeri, 1993, 1994).

Esta unión activa a la plaqueta e induce la señal intraplaquetaria necesaria para la expresión de uno de los más importantes complejos proteicos de membrana, la glucoproteína IIb-IIIa (GPIIb/IIIa) (Blockmans et al., 1995). Este otro heterodímero calcio-dependiente está compuesto por dos glucoproteínas, la primera de las cuales es una molécula de dos cadenas con un pm=136.000, que a su vez se disocia en una cadena pesada (p.m.=125.000), llamada GPIIb-alfa y otra cadena ligera (p.m.=23.000) la GPIIb-beta. La GPIIb-alfa está compuesta por una sola cadena y tiene un peso molecular de 90.000. Al microscopio electrónico, GP IIa/IIIb tiene una cabeza globosa con dos colas flexibles ancladas en la membrana Bennet, 1992) (Fig 2).

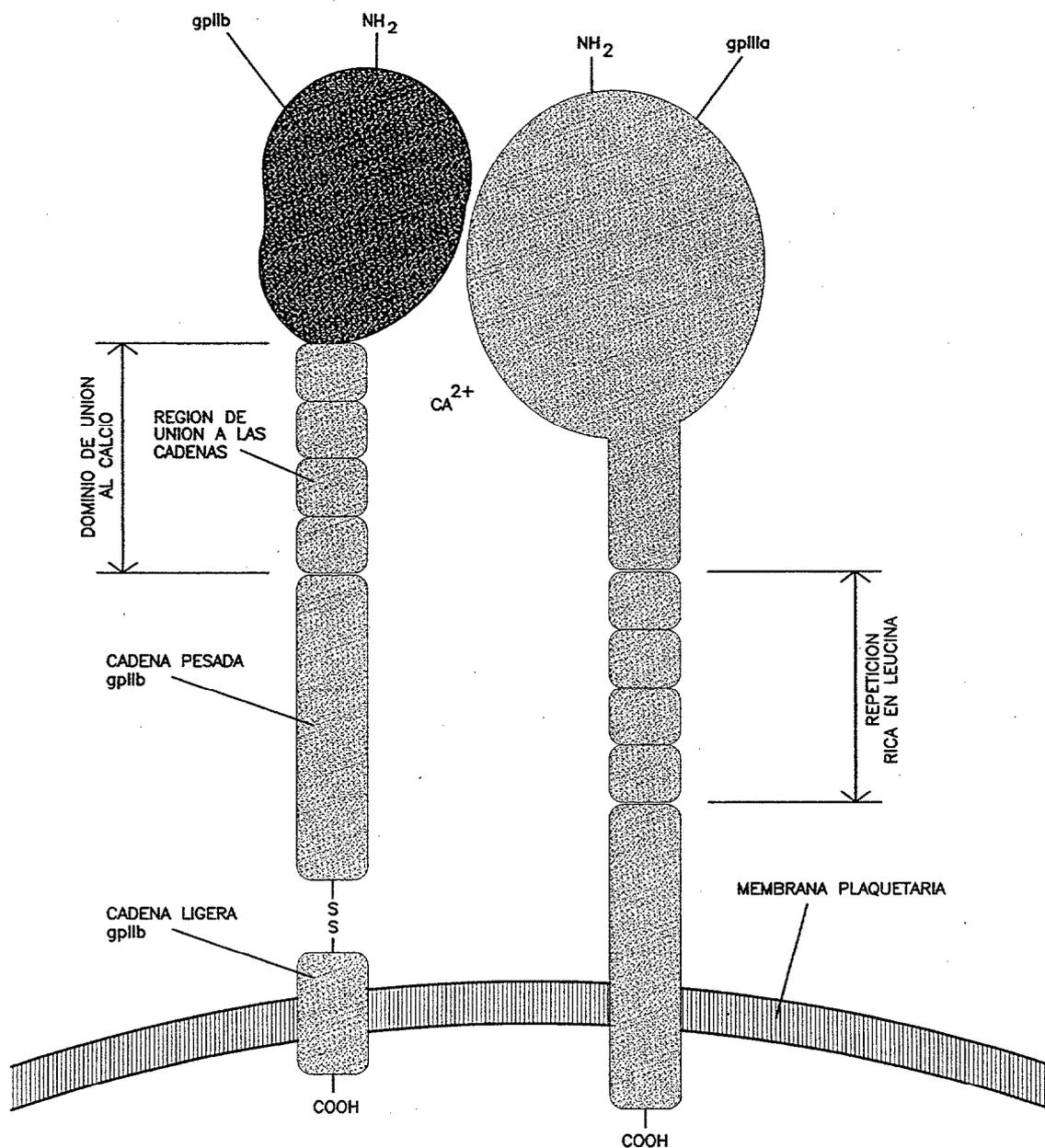


Fig. 2. Representación esquemática de la glucoproteína IIb/IIIa (Adaptado de Bennet, 1992)..

Una vez activada la plaqueta, las GPIIb y GPIIIa actúan como un receptor multifuncional con diversos dominios funcionales, entre los que destacan los que servirán de unión para al menos cuatro importantes proteínas adhesivas: **fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y FvW**. Además, posee un sitio de inserción a la membrana y un lugar de anclaje al esqueleto intracelular. La ausencia o conformación anormal de GPIIb-IIIa da lugar a la trombostenia de Glanzmann, desorden hereditario de la membrana plaquetaria, bien descrito en humanos y caracterizado por una deficiente agregación plaquetaria y ausencia de fibrinógeno en los gránulos alfa de las plaquetas (George y Nurden, 1994). Estas dos glucoproteínas así activadas se unirán también al FvW a través de la secuencia tripeptídica arginina-glicina-ácido aspártico del C-terminal del FvW. Este complejo da lugar a la expansión celular y a la adhesión plaquetaria irreversible (Fig 3) (Bennet, 1992).

La **trombina** es otro potente estimulante plaquetario, inductor de cambios en la forma, agregación plaquetaria y secreción desde los gránulos densos, gránulos alfa y lisosomas. Se acopla con un receptor extraplaquetario N-terminal y un dominio C intracitoplásmico, como fue puesto de manifiesto por Vu et al. en 1991. Una vez activada la plaqueta, los receptores se internan en la misma como endosomas, con lo que la célula pierde su capacidad de reaccionar ante la trombina. Igualmente, este agonista también puede unirse a GPIIb, pero sin que se haya evidenciado respuesta funcional alguna (Yamamoto et al, 1991).

La adhesión de las plaquetas al colágeno del tejido conectivo induce cambios en la forma y liberación de sustancias a partir de los gránulos densos, y son varios los receptores implicados, como los GP Ia IIa, GP IV y GPVI de modo directo, y la GPIIbIIIa a través del FvW y la fibronectina (Coller et al, 1989); sin embargo se desconocen estudios que evidencien enteramente este mecanismo.

Para el **ADP** parece existir un solo receptor del tipo P<sub>2</sub>T purínico, que aún no ha sido enteramente identificado, postulándose que sea una proteína

con un peso molecular de 43 kDa. Contrariamente a esta afirmación, Colman (1986) propone la existencia de dos receptores diferentes. En ciertas condiciones experimentales el ADP es capaz de inducir agregación plaquetaria y otros fenómenos intracitoplásmicos, pero "in vivo" actúa únicamente en la agregación secundaria.

De igual modo, la **epinefrina** o **adrenalina** induce agregación primaria en condiciones experimentales, en concentraciones muy superiores a las normalmente existentes en sangre circulante, probablemente a través del ADP, lo cual podría significar que su acción sea mas bien sensibilizante para la de otros agonistas a través de receptores  $\alpha_2$  (Seen et al, 1993). Además, han sido descritos receptores para la **serotonina** (Salzman et al, 1991), **TxA<sub>2</sub>** y **endoperoxidasa cíclica** (Takahara et al., 1990; Dorn, 1991), **factor de activación plaquetario** (Chau y Jii, 1989), **vasopresina** (Inaba et al., 1988), y las **prostaglandinas I<sub>2</sub>**, **D<sub>2</sub>** (Miller y Gorman, 1979) y **E<sub>2</sub>** (Eggerman et al, 1986).

Una vez acoplados los agonistas a sus correspondientes receptores, estos transmiten la señal por medio de enzimas generadoras de mensajeros secundarios. Estos sistemas son la adenilato-ciclasa, la fosfolipasa-C y la fosfolipasa-A<sub>2</sub>, siendo los correspondientes mensajeros generados por éstas el inositol (1,4,5) trifosfato el calcio, el diacilglicerol, las prostaglandinas y TxA<sub>2</sub>, y el AMP-c (Blockman et al., 1994).

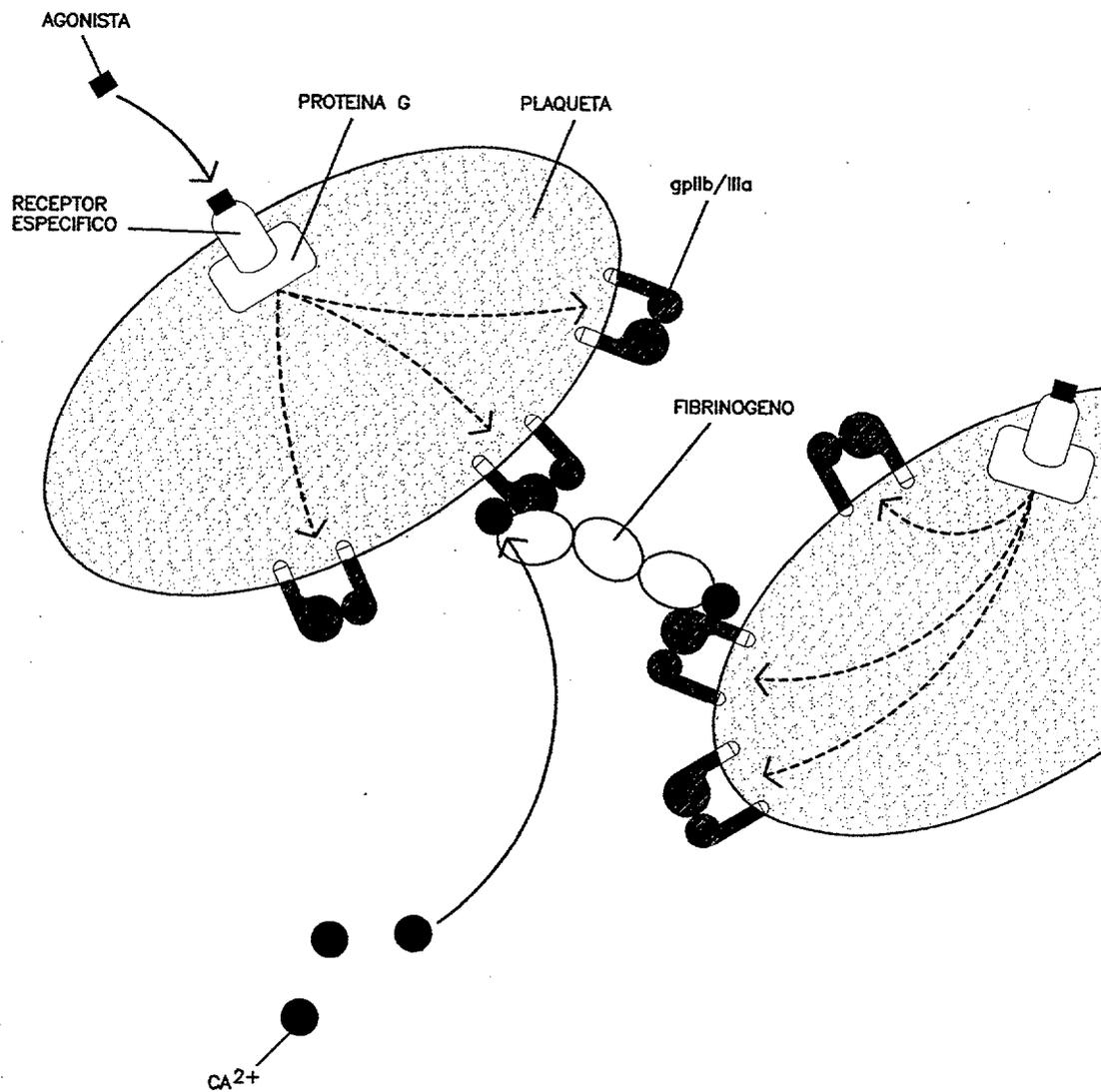


Fig 3. Descripción esquemática del proceso de agregación plaquetaria (Adaptado de Bennet, 1992).

## 2. 2.- MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD PLAQUETARIA.

### 2. 2. 1.- Métodos clínicos.

El tiempo de hemorragia o de sangría de la mucosa bucal es el test clínico más comúnmente empleado en la práctica clínica ante la sospecha de una disfunción plaquetaria en pacientes caninos con recuentos plaquetarios normales y con signos clínicos compatibles con un trastorno hemorrágico primario. Suele emplearse un dispositivo especialmente diseñado para tal fin (Couto, 1992).

### 2. 2. 2.- Agregación plaquetaria "in vitro".

Durante los últimos treinta años, la agregación plaquetaria "in vitro" ha sido la técnica laboratorial más comúnmente empleada para detectar aumentos o disminuciones de la actividad agregante de estas células. Este test puede realizarse en SC o PRP por el método de impedancia eléctrica, o en PRP mediante el método turbidimétrico que mide la transmisión de un haz de luz. Ninguna de las técnicas muestra claras ventajas sobre la otra. Tanto en literatura humana como veterinaria, ambos métodos han sido descritos y ampliamente utilizados (Ingemar-Wojensky, 1984; Abbate et al., 1986; Collins et al., 1994).

**A.- Método de impedancia.** Con este método y usando SC, al contar con la presencia de los restantes elementos formes, podría considerarse que trabajamos en una situación más próxima al proceso de coagulación "in vivo", pero hace más difícil evaluar a las plaquetas de forma separada, por la incuestionable influencia que hematíes, y especialmente leucocitos, tienen en el proceso de coagulación sanguínea. Ofrece la ventaja adicional de poder evaluar la secreción de ATP por parte de la plaqueta (Abbate et al, 1986).

**B.- Método turbidimétrico.** Este método, descrito por Born en 1962, implica la utilización de PRP, aportando información parcial de lo que sería

el proceso de coagulación "in vivo", pero por el contrario elimina la influencia de los restantes elementos formes, facilitando la evaluación de la función plaquetaria con una mayor independencia. Uno de los posibles inconvenientes de este método reside en que en el proceso de obtención del PRP se pueda actuar de forma selectiva sobre esta población celular y no incluir las plaquetas de mayor tamaño (Remaley et al., 1989).

La agregometría "in vitro" tiene aplicaciones clínicas en el diagnóstico de diversas coagulopatías de origen plaquetario, como la antes mencionada trombostenia de Glanzmann o el síndrome de Bernard-Soulier (Remaley et al., 1989).

La respuesta trombocítica "in vitro" a distintos tipos y concentraciones de agonistas ha sido estudiada por numerosos autores en el humano, en distintas especies de animales de experimentación y domésticos, y comparando distintas razas de perros entre sí (Clemmons y Meyer, 1984; Jancinova et al., 1991; Soslau et al., 1993; Giolino et al., 1993).

**C.- Citometría de flujo.** Este método detecta plaquetas circulantes activadas determinando cambios que tienen lugar en la morfología celular, basándose en las diferentes propiedades de difusión de la luz existentes entre discocitos y esferocitos, en la expresión del fibrinógeno ligado a la plaqueta, la conformación de neoantígenos específicos en el fibrinógeno o en su receptor plaquetario y en la expresión de proteínas granulares como la P-selectina en la membrana celular como resultado del proceso de secreción plaquetario (Ruf y Patschke, 1995).

**D.- Marcadores de actividad plaquetaria.** Recientemente, se han descrito diversos marcadores inmunológicos de la actividad plaquetaria. Se trata de anticuerpos que reconocen antígenos que aparecen en las plaquetas activadas pero no cuando se encuentran en reposo. Algunos de estos marcadores de activación se encuentran en moléculas transportadas a la superficie durante el proceso de activación; otros son epitopos que aparecen en las plaquetas activadas tras ciertos cambios conformacionales en las glucoproteínas de la membrana.

**a) P-selectina (GMP-140):** Como ya mencionamos más arriba, esta molécula adhesiva se encuentra en los gránulos alfa de la plaqueta y en los componentes de membrana de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, orgánulos que almacenan el FvW endotelial. Al liberarse el contenido de los mismos, se transloca a la superficie plaquetaria. Esta molécula es responsable de la adhesión de las plaquetas activadas a monocitos y granulocitos.

**b) Sitio de unión del fibrinógeno al receptor GPIIb/IIIa.** Este epitopo aparece en la superficie del citado receptor como consecuencia de los cambios morfológicos que acontecen al activarse la plaqueta.

## 2.3.- PLAQUETAS Y ENFERMEDAD

La función plaquetaria ha sido evaluada en diversas enfermedades y especies, con resultados variables (Myrup et al., 1991; Kukaszky et al., 1992; Thomas et al., 1992). Describimos a continuación solo aquellas situaciones de especial interés o relevancia para nuestra experiencia.

### 2.3.1.- Cáncer y funcionalidad plaquetaria.

Las anomalías hemostáticas asociadas a una enfermedad tumoral pueden atribuirse a la propia patogenicidad del cáncer, a los efectos directos o indirectos del tratamiento quimioterápico y/o a la disfunción orgánica secundaria al tumor primario o sus metástasis (O'Keefe y Couto, 1988).

En el paciente con cáncer, la hiperagregabilidad plaquetaria se puede asociar a tres importantes procesos: fenómenos tromboembólicos, coagulopatías y metástasis.

#### A.- Enfermedad tromboembólica.

Entre los distintos tipos de alteraciones paraneoplásicas, o complicaciones del cáncer que ocurren a distancia del tumor, y que pueden estar mediadas por hormonas, inmunoglobulinas u otros mediadores humorales, se encuentran diversas alteraciones de la coagulación. Ya Trousseau describió en 1865 una mayor incidencia de trombosis venosas en pacientes con cáncer, habiéndose descrito un conjunto de enfermedades tromboembólicas paraneoplásicas en la red venosa, arterial o en ambas, bajo la denominación de síndrome de Trousseau (Naschitz et al., 1993).

La existencia de perfiles de coagulación indicando un aumento en la activación constituye un hallazgo común en pacientes humanos afectados de cáncer. La presencia del fibrinopéptido A, un producto de degradación del fibrinógeno e indicador sensible de activación de la coagulación de bajo grado, se observó en prácticamente todos los pacientes humanos con

## Revisión bibliográfica.

leucemias agudas y/o con tumores sólidos (O'Keefe y Couto, 1988). Aunque en la literatura sobre animales de compañía con tumores no hemos encontrado datos similares con relación a este fibrinopéptido, si que hay evidencia del aumento de activación a través de las proteínas de la coagulación (O'Donnell et al, 1981; Madewell et al., 1980).

Se conocen como estados hiperagregables al conjunto de problemas clínicos, pobremente definidos, que predisponen a un paciente a padecer trombosis de manera inusual. Se clasifican como **primarios**, si obedecen a desórdenes intrínsecos o directos de las proteínas responsables de la coagulación o la fibrinolisis, y **secundarios**, si incluyen anomalías de la coagulación y la fibrinolisis inducidas por neoplasias malignas, preñez, fármacos contraceptivos de uso oral o en el síndrome nefrótico. Además, esta situación de hiperagregabilidad se presenta en desórdenes mieloproliferativos, hemoglobinuria paroxística nocturna o trombocitopenia inducida por heparina, anomalías de vasos sanguíneos y reología (Schafer, 1985).

Los tromboembolismos son únicamente superados por las infecciones como causa de muerte en enfermos con cáncer. En ocasiones, la alteración circulatoria se detecta con antelación, precediendo a las manifestaciones clínicas del cáncer en meses e incluso años, hasta el punto de que una tromboflebitis migratoria superficial inexplicada se acepta como signo clínico-patológico sospechoso de la presencia de una neoplasia maligna oculta (Schafer, 1985).

Igualmente, otro dato referenciado es la presencia de niveles anormalmente altos de productos de degradación de la fibrina asociados a anomalías en la función plaquetaria, aunque no se ha justificado esta relación (Rickles y Edwards, 1983).

La formación exacerbada de fibrina en pacientes con cáncer ha impulsado a varios grupos de investigadores a buscar sustancias con actividad procoagulante en extractos de diversos tejidos neoplásicos (Gordon y Lewis, 1978). En estos estudios se ha encontrado, a partir de varios tumores

humanos y animales, un producto: el procoagulante de cáncer A. Ante la duda de si este producto se encontraba tanto en tejidos normales como tumorales o era exclusivo de estos últimos, se procedió al análisis experimental en cultivos de fibroblastos transformados en medio libre de suero, y se evidenció que el citado procoagulante de cáncer A era producido por las células malignizadas (Gordon y Lewis, 1978).

De modo indirecto, es también interesante la observación realizada por van Giezen y Jansen en 1992, sobre la disminución de la actividad fibrinolítica de diversos cultivos celulares tras la administración de dexametasona, lo que no se correspondía con un estado pretrombótico, como cabría esperar en pacientes tratados con la misma. La administración de este fármaco no se correlacionó con la alteración de ninguno de los parámetros medidos en el sistema de coagulación, pero sí con una inhibición de la agregación plaquetaria.

Otro dato significativo es la variabilidad de los tromboembolismos dependiendo del tipo histológico del tumor, pues la incidencia media, que varía entre un 5% y un 15% según los distintos autores (Ambrus et al., 1975), puede mostrar un notable aumento en ciertos tumores, como el carcinoma pancreático, en el que se puede llegar hasta un 50% (Schafer, 1985).

Si bien se han diagnosticado tromboembolismos en perros con neoplasias malignas, sólo se dispone de datos en descripciones de casos aislados, por lo que su incidencia es desconocida (McNeil et al, 1997).

## **B.- Alteraciones cuantitativas de las plaquetas.**

### **a) Trombocitopenias.**

La incidencia de complicaciones hemostáticas en pacientes humanos con cáncer es muy elevada. Así, en algunas poblaciones el 92% de los pacientes mostraron resultados anormales en alguno de los parámetros de coagulación sanguínea evaluados. De los casos descritos, un 4% a un 11% de los pacientes humanos con tumores padecen trombocitopenia, que en algunos estudios ha sido de hasta un 27%, sin que la producción plaquetaria

estuviera significativamente disminuida. En estos casos, se evidenció una mayor destrucción celular junto a fenómenos de activación y secreción (Rickles y Edwards, 1983).

En medicina veterinaria también se han descrito anomalías en el mismo sentido. En un estudio de 100 perros con distintas neoplasias en el que se investigaron diversas pruebas rutinarias de coagulación, 83 presentaron alteraciones en una o más de ellas. En 36 se observó trombocitopenia sin evidencia clínica de hemorragia. De los 41 casos con neoplasias linfohematopoyéticas, 21 eran trombocitopénicos, al igual que 12 de los 59 restantes con tumores sólidos (Madewell et al., 1980). En este trabajo se indicaron distintas causas como responsables de la reducción cuantitativa de las plaquetas, entre las que figuran:

1.- Disminución de la producción plaquetaria, debida a una de las siguientes causas: mieloptosis, síndromes mielodisplásicos, tumores estrógeno-secretores y drogas antitumorales (Helfand, 1988).

2.- Aumento de la destrucción plaquetaria. Entre sus causas se citan: Trombocitopenias inmuno-mediadas (TIM), acortamiento del periodo de supervivencia de la plaqueta (O'Donnell et al. 1981) y microangiopatía.

3.- Incremento del consumo plaquetario. La causa más común es la coagulación intravascular diseminada (CID), mecanismo patogénico en el que tiene lugar una activación intravascular de la coagulación sanguínea, simultáneamente a la activación del sistema fibrinolítico, como resultado de la exposición de la sangre a superficies anormales o a la entrada de material trombógeno.

La subsecuente formación de trombina da lugar a una agregación plaquetaria generalizada y a la polimerización de fibrina (Slappendel, 1988). También, tumores que inducen directa o indirectamente hemorragias pueden causar trombocitopenias transitorias.

4.- Secuestro plaquetario. Frecuente en caso de neoplasias esplénicas entre las que destacan el linfosarcoma, hemangiosarcoma y hemangioma. La

esplenomegalia y los tumores vasculares no esplénicos diseminados pueden inducir trombocitopenia, al secuestrar un gran número de plaquetas (Helfand, 1988).

#### **b) Trombocitosis y trombemias.**

Tanto en pacientes humanos como caninos con cáncer se han descrito trombocitosis, que pueden obedecer a las siguientes causas:

1.- Trombocitosis idiopática maligna o trombemia. Más común en tumores sólidos, se desconoce el mecanismo de producción, si bien se especula con la posible liberación de algún factor estimulante, pues el ritmo de producción aumenta, independientemente de la leve a moderada reducción del tiempo de supervivencia de las plaquetas.

2.- Desórdenes mieloproliferativos. Estos incluyen un amplio grupo de anomalías de la médula ósea que producen células sanguíneas de modo inadecuado. Así como en humanos con leucemia mielógena crónica, policitemia vera o trombocitemia ha sido diagnosticada trombocitosis, esta también se ha descrito en perros con leucemia megacarioblástica, o con enfermedad mieloproliferativa megacarioblástica (Helfand, 1988).

3.- Estados de sobrecompensación. Está suficientemente demostrado el hecho de que la trombocitopenia actúa como estímulo inductor de trombocitosis, y que la magnitud de la respuesta megacariocítica es proporcional al grado de trombocitopenia (Jackson y Edwards, 1977). En los procesos cancerosos se producen frecuentes situaciones trombocitopénicas que pueden desencadenar trombocitosis reactivas, entre los que se incluyen respuestas a la trombocitopenia por CID crónica, por quimioterapia, como las observadas en tratamientos con cisplatino, dacarbacina o arabinósido de citosina, y en casos de hemorragia tumoral aguda (Helfand, 1988).

4.- Trombocitosis inducida por los alcaloides de la Vinca. Dosis altas de vincristina y otros alcaloides del grupo dañan las plaquetas y acortan el tiempo de supervivencia de las mismas (Steurer et al., 1988), pero desde la década de los 60 se observó que los mismos fármacos, a dosis bajas,

producían un aumento del número de trombocitos sin una disminución previa (Robertson y McCarthy, 1969). Investigaciones sucesivas demostraron que esta trombocitosis era el resultado de aumentos en la megacariocitopoyesis y trombocitopoyesis. Una probable explicación a este fenómeno podría estar en el hecho de que los citados alcaloides induzcan ciertos daños o alteraciones plaquetarias, de tal manera que estas células dejen de ser reconocidas o detectadas por el sistema regulador de la trombopoyesis (Jackson y Edwards, 1977).

5.- Esplenectomía. Este procedimiento quirúrgico produce en el perro trombocitosis de hasta 1.000.000 de células por  $\mu\text{L}$ , fenómeno que necesita frecuentemente meses o años para normalizarse. Sin embargo, los perros esplenectomizados como tratamiento a TIM, no presentan esta respuesta de forma rutinaria (Helfand, 1988)

6.- Deficiencia de hierro. La trombocitosis es un hallazgo común tanto en humanos como en perros con anemia ferropénica (Helfand, 1988).

### **C.- Alteraciones cualitativas de las plaquetas.**

#### **a) Cuadros neoplásicos asociados a una función plaquetaria disminuida.**

No siempre es posible encontrar una correlación entre malignidad y función plaquetaria anormal, como tampoco la disfunción plaquetaria lo hace con alteraciones en el tiempo de hemorragia o la manifestación clínica de pérdida de sangre (O'Keefe y Couto, 1988). Sin embargo han sido descritas diversas situaciones asociadas a alteraciones de la función plaquetaria:

**1.- Cuadros mieloproliferativos y mielodisplásicos.** Estos conllevan, de forma inherente, malfunción plaquetaria, siendo la más frecuente de ellas la agregación plaquetaria dificultada o impedida. Igualmente se han descrito defectos en la adhesión, reducción de la actividad de factor plaquetario 3, y un menor almacenamiento de diversos constituyentes normales de la plaqueta (Helfand, 1988).

**2.- Trombocitopatía inducida por alcaloides de la vinca** (Helfand, 1988). Aunque incluida en esta sección, por su importancia en este trabajo se tratará en un apartado específico.

**b) Trombocitopatías congénitas del perro.** Existen diversas alteraciones funcionales en los trombocitos cuya aparición está determinada genéticamente.

**1.- Trombopatía trombástica canina.** Desorden hereditario diagnosticado en Otterhounds, con características comunes a la trombastenia de Glanzmann y al síndrome de Bernard-Soulier humanos. Las plaquetas de los animales afectados muestran incapacidad para agregar en presencia de estímulos fisiológicos y no se produce retracción del coágulo. Estas manifestaciones trombásticas se deben a una reducción (heterozigosis) o ausencia (homozigosis) de las proteínas de membrana GP IIa/IIIb. Además, una proporción variable de las plaquetas de estos enfermos son anormalmente grandes, y con características morfológicas similares a las del síndrome de Bernard-Soulier. Clínicamente se presenta como sangrado de las superficies mucosas, que se exacerba con manipulaciones quirúrgicas, trauma y estrés.

**2.- Trombopatía canina.** Alteración autosómica del Basset Hound y el Foxhound, con cuadros hemorrágicos clínicamente detectables (especialmente otophematomas en el Basset), debida a una alteración metabólica del AMP-c. Curiosamente, estas plaquetas no presentan alteración morfofuncional alguna en reposo ni durante las fases de activación y secreción. El análisis ultraestructural de sus componentes tampoco presenta anomalías. El mencionado trastorno metabólico del AMP-c se traduce en disfunción celular y consecuentes hemorragias.

### **2. 3. 2.- Plaquetas y metástasis.**

La metástasis del cáncer es un proceso altamente coordinado en el cual ciertas subpoblaciones fenotípicas de células tumorales poseen la

capacidad de invasividad y crecimiento autonómico en lugares distantes al tumor primario. Estas células interactúan específicamente con células circulatorias del huésped, como neutrófilos, linfocitos y plaquetas, así como con células endoteliales, fibras musculares lisas y/o fibroblastos.

La interacción de las células neoplásicas con los componentes estructurales acelulares, como la membrana basal o la matriz extracelular, son esenciales en este proceso (Honn et al., 1992). Posiblemente otros fenómenos, como la angiogénesis, jueguen también su papel, aunque este punto no está totalmente clarificado. Los datos acumulados indican que la habilidad de las células tumorales para interactuar con las plaquetas es uno de los muchos determinantes necesarios para el establecimiento y desarrollo de metástasis (Honn et al., 1992).

En varios experimentos se ha demostrado la capacidad de agregación plaquetaria de diversos tipos de células tumorales humanas o animales (Tanaka et al., 1986), y que dicha capacidad presentaba una amplia correlación con su potencial metastásico (Gassic et al., 1976).

La primera observación significativa en este sentido fue la realizada por Gassic et al. en 1968, quienes comprobaron que después de inyectar células tumorales a ratones, los individuos trombocitopénicos presentaron un porcentaje de metástasis significativamente menor que el lote de control, existiendo una reducción directamente proporcional a la intensidad de la trombocitopenia. En aquel momento, se desconocía el papel que los trombocitos podían desempeñar en la instauración y desarrollo de metástasis, si bien se establecieron algunas hipótesis a este respecto.

A partir de este hallazgo, varios grupos evidenciaron la complejidad del mecanismo de la metástasis, centrándose en la relación célula tumoral-plaqueta-célula endotelial (Honn et al., 1986). Las plaquetas intervendrían en el proceso a los siguientes niveles:

- 1.- Estabilizando la parada de las células neoplásicas en los vasos.
- 2.- Estimulando la proliferación de estas células.

3.- Promoviendo la extravasación de las mismas, al potenciar la retracción de las células endoteliales.

4.- Potenciando la interacción de la célula tumoral con la matriz extracelular (Honn et al., 1992).

Las metástasis hematógenas se desarrollan a partir de células cancerígenas detenidas en la microcirculación que sobreviven al fenómeno de detención y anclaje. Tanto estas células como los vasos resultan dañados, desarrollándose una respuesta inflamatoria y una activación de la coagulación, lo que conjuntamente con la angiogénesis juega un importante papel en la fisiopatología del proceso (Weiss et al., 1988).

Las células tumorales se introducen en la circulación sanguínea por "sembrado pasivo" o por movimientos activos. Los vasos sanguíneos neoformados (angiogénesis) son normalmente de tipo fenestrado, y por tanto más permeables, lo que facilita el paso de las células al torrente circulatorio sin necesidad de alteraciones degenerativas.

En algunos tumores, como los sarcomas, la sangre circula por cisuras vasculares delimitadas por vasos sanguíneos, con lo cual la siembra celular se realiza directamente, sin necesidad de alterar la membrana basal vascular. En ciertas localizaciones anatómicas, como son los capilares pulmonares, la membrana basal es muy fina y prácticamente carece de haces de colágeno, lo que facilita el trasiego celular.

Por último, en las inflamaciones producidas por la interacción célula tumoral-endotelio participan leucocitos y macrófagos que a través de fenómenos heterolíticos facilitan tanto la vehiculación hacia sangre como la extravasación de las primeras. En este sentido, está demostrada la relación entre la capacidad de las células cancerígenas para segregar colagenasa IV, que degrada el colágeno IV de la membrana basal, y la capacidad de la neoplasia en cuestión para invadir tejidos y metastatizar (Weiss et al., 1988).

Agregación plaquetaria inducida por células tumorales (APICT): Los elementos formes sanguíneos poseen un mayor o menor grado de capacidad

de deformación para adaptarse a capilares de menor diámetro, especialmente los monocitos, cuyas propiedades reológicas les permiten circular por vasos de menor diámetro sin quedar atrapados. Las células tumorales son menos deformables y parecen incapaces de compensar reológicamente su mayor diámetro. La entrada a los capilares requiere de la célula tumoral la transformación de su forma esférica en cilíndrica, para lo que es ayudada por el plasma que actúa como lubricante entre ésta y la pared, pero una vez en tránsito, la tendencia a recuperar su forma esférica hace que se desplace al plasma y entre en rápido contacto con las células endoteliales, lo que provoca la parada de aquella (Weiss et al., 1988).

En un corto periodo de tiempo (1-2 minutos) puede observarse la unión de la célula tumoral con la célula endotelial, y un inicio de asociación plaquetaria. Dependiendo del tipo de célula tumoral que se trate, entre los 2 y 10 minutos siguientes se produce una clara agregación plaquetaria, lo cual sugiere que una interacción específica induce la activación plaquetaria. Las células tumorales extienden numerosos pseudópodos citoplasmáticos provocando la liberación de mediadores químicos y la activación tumoral (Honn et al., 1992).

La interacción brusca de células tumorales y vasos sanguíneos induce una reacción inflamatoria mediada por polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, linfocitos, y linfocitos NK. Las interacciones directas entre plaquetas y leucocitos se establecen a través de la P-selectina y el fibrinógeno, creándose un microambiente común que permite o facilita la transferencia de mediadores. Por un lado, los polimorfonucleares neutrófilos liberan una serie de radicales tóxicos para las células tumorales que juegan un importante papel en la destrucción de las células detenidas. Por otro, esta reacción inflamatoria parece promover la invasión por parte de las células cancerosas supervivientes, al dañar también los tejidos normales (Weiss et al., 1988; Klinger, 1997).

Además, las plaquetas podrían actuar como “escudos protectores” de las células cancerosas y protegerlas de los diversos mecanismos que impiden

el asentamiento y desarrollo de las metástasis, hasta que se complete el proceso de extravasación (Honn et al, 1981). Se han descrito dos patrones diferentes en este proceso: la migración activa, y la parada y proliferación. En la primera, seguirían las rutas de migración de los leucocitos del huésped; en la segunda, sería el crecimiento del tumor el que alterando la pared vascular permite la extravasación. Una vez desplazado el endotelio, las células tumorales contactan con la lámina basal y aumenta notablemente el número de células en mitosis. En este punto, las células obtienen sus nutrientes por procesos de difusión, constituyendo micrometástasis, y a partir de aquí se inicia la neovascularización, que dará lugar a las metástasis con diámetros superiores a 1 mm (Weiss et al., 1988).

El amplio conocimiento de los mecanismos expuestos, hace que el bloqueo de esta interacción se haya convertido en el objetivo primordial de numerosos grupos de investigación (Gordon et al, 1979; Honn et al., 1986).

Muchos experimentos farmacológicos han demostrado que la potente actividad antimetastásica de diversas sustancias está en íntima relación con su capacidad inhibidora de la APICT y que esta capacidad es esencial para el establecimiento de metástasis. Este hecho se ha demostrado utilizando péptidos sintéticos o anticuerpos monoclonales anti APICT, que inhiben o suprimen las metástasis cancerosas (Honn et al., 1992).

Honn y colaboradores fueron los primeros en demostrar que la prostaciclina, un metabolito del ácido araquidónico primariamente sintetizado por las células del endotelio vascular, reducía notablemente el número de metástasis pulmonares y prevenía completamente la implantación de células melánicas B<sub>16a</sub> en el hígado de ratones inoculados experimentalmente. A partir de estos datos, se llevaron a cabo numerosas investigaciones sobre la prostaciclina y otras sustancias análogas, en la mayoría de los cuales se detectaron actividades inhibitoras que actúan sobre la interacción célula tumoral-plaqueta-célula endotelial (Schneider et al., 1994).

### 2. 3. 3.- Plaquetas e inflamación.

La importancia de las plaquetas en el proceso inflamatorio ha sido puesta de manifiesto en los últimos años, principalmente en base a estudios de la interacción entre plaquetas y leucocitos, especialmente tras la utilización de nuevas técnicas como la citometría de flujo y los marcadores de actividad plaquetaria. Sin embargo, son muchos los aspectos del proceso que aún se desconocen.

Diversas investigaciones recientes indican la existencia de propiedades proinflamatorias de los trombocitos, tales como la liberación de mediadores flogísticos, atracción de otras células inflamatorias, quimiotaxis y modulación de la actividad celular en el proceso. Además hay evidencia de que las trombosis microvasculares y un estado procoagulante intervienen en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica, cuya existencia puede ser sospechada en casos de recuentos plaquetarios anormalmente altos (Collins et al, 1994). En base a estos datos, se realizaron estudios de activación y agregación plaquetaria, los cuales mostraron una activación plaquetaria aumentada en base a la detección de diversas proteínas granulares en plasma y la expresión de marcadores de superficie como la P-selectina (Collins y Rampton, 1997).

Otros cuadros inflamatorios cursan también con estados de hiperagregabilidad plaquetaria, y con un elevado número de plaquetas circulantes, y en ciertas patologías, como algunas enfermedades pulmonares, se ha demostrado la participación de los trombocitos en las respuestas vasculares y perivasculares, y su participación vía humoral en la formación de tromboembolismos (Bowers, 1989).

En la actualidad se ha demostrado que los trombocitos, los granulocitos neutrófilos y, en menor grado, los monocitos tienen la capacidad de interactuar entre sí, tanto aisladamente como en sangre completa, produciéndose adhesiones no solo plaqueta-plaqueta, sino también plaqueta-leucocito, tras la expresión de la **proteína granular de membrana 140 (GMP-140) o P-selectina**, lo que se demostró al inhibirse esta

unión utilizando un anticuerpo monoclonal específico (Rinder et al, a y b, 1991). De igual modo se observó que los cambios de forma experimentados por los leucocitos al inicio de la inflamación ("rolling") están mediados por la P-selectina (Nash, 1994; Norman et al., 1995), y la ausencia de esta molécula adhesiva en animales de experimentación da lugar a una marcada incapacidad para la producción de este "rolling" leucocitario (Frenette et al, 1995). Al parecer, la P-selectina un vez expresada estimula la actividad del Factor Tisular monocítico (Furie y Furie, 1996).

La activación plaquetaria inducida por leucocitos es otro evento del proceso inflamatorio investigado en el contexto que nos ocupa, en el que juega un importante papel el factor de agregación plaquetario (Zhou et al., 1992)

#### 2. 3. 4.- Trombocitopenias inmuno-mediadas y actividad plaquetaria.

A.- La trombocitopenia inmuno-mediada (TIM) es una causa frecuente de fallo en la hemostasia primaria del perro, que puede ser desencadenada por una gran variedad de causas. Independientemente de éstas, el mecanismo patogénico es muy similar en los distintos casos: Altos niveles de anticuerpos anti-plaquetas (AAP), destrucción plaquetaria aumentada a cargo del sistema mononuclear fagocítico (SMF) y una marcada reducción de la vida media de las plaquetas. Si la destrucción plaquetaria excede la producción compensatoria de los megacariocitos medulares, tiene lugar la trombocitopenia. La **púrpura idiopática trombocitopénica (PIT)** humana, en su forma crónica, es muy parecida desde el punto de vista clínico a la TIM canina, por lo que es frecuente extrapolar resultados de aquella a esta (Mackin, 1995 a).

La vida media de una plaqueta canina es de 8 a 12 días, a partir de los cuales son eliminadas de la circulación por macrófagos tisulares, y es en el bazo donde este fenómeno se produce más activamente. Además, este órgano almacena en su circulación aproximadamente un tercio del total de

plaquetas circulantes, cuyo número normal es de 200.000 a 500.000 por  $\mu\text{L}$  (Helfand, 1988). Desconocemos la existencia de estudios sobre la duración media de las plaquetas en perros con TIM.

Los AAP están en su mayoría dirigidos hacia los complejos glucoprotéicos GPIIb/IIIa o bien hacia GPIb/IX, en donde, como hemos expuesto anteriormente, se localizan importantes receptores desde el punto de vista funcional (Fujisawa et al., 1993).

En la especie humana se han descrito disfunciones plaquetarias en pacientes con PIT, aunque su prevalencia es desconocida (Balduini et al., 1987; George y Shattil, 1991). Sin embargo hay muy poca información sobre función plaquetaria en perros con TIM. En la práctica clínica no es posible predecir la aparición de hemorragias en base al recuento plaquetario de un paciente, y es frecuente que a pesar de presentar un número similar de plaquetas, unos perros muestran una mayor tendencia a padecer hemorragias que otros, por lo que puede sospecharse que existan trastornos funcionales. En el estudio realizado por Kristensen et al., empleando un método indirecto de evaluación, se observó que empleando suero de perros con TIM se inhibía la función plaquetaria "in vitro" de trombocitos extraídos de perros sanos. Sin embargo, los resultados obtenidos no permitieron establecer correlaciones con las presentaciones clínicas, lo que podría indicar que la combinación de un escaso número de plaquetas y su hipofunción puedan ser responsables de la intensidad del cuadro hemorrágico (Kristensen et al, 1994).

El proceso de captación y destrucción celular por parte del SMF se ve favorecido por el aumento de AAP ligados a las membranas plaquetarias y por los receptores macrofágicos relacionados con la subunidad Fc (fragmento cristalizante) de las moléculas de inmunoglobulinas que se encuentran unidas a las plaquetas. La destrucción plaquetaria se inicia con la unión de los citados receptores de los macrófagos a las plaquetas recubiertas de anticuerpos. Como se ha indicado con anterioridad, el bazo es un muy activo en la destrucción inmuno-mediada de las plaquetas. El SMF esplénico

procesa los antígenos plaquetarios fagocitados para presentarlos a los linfocitos productores de anticuerpos, ampliando así la respuesta inmune (Mackin, 1995 a).

La TIM estimula la trombocitopoyesis, si bien en ocasiones los AAP pueden reaccionar de forma cruzada con los megacariocitos, por lo que la ausencia de trombocitopoyesis puede significar una lesión megacariocítica mediada por los mismos anticuerpos, en cuyo caso el descenso del número de plaquetas sería mucho más notable y duradero. El examen de la médula ósea de estos pacientes suele mostrar cambios degenerativos como cariólisis, citoplasmas espumosos, vacuolizaciones y escasas granulaciones (Mackin, 1995 a).

En los casos en que la TIM aparece de forma espontánea sin que pueda establecerse causa distinta a la autoinmune, se habla de una TIM primaria. En cambio, cuando la destrucción plaquetaria mediada por anticuerpos está relacionada con otros agentes morbosos, fármacos, factores medioambientales, etc., nos encontramos con una TIM secundaria (Tabla 1) (Helfand et al., 1985). En la práctica no es fácil establecer estas categorías ya que son numerosas las causas que pueden estar implicadas en el proceso (Handagama y Feldman, 1988). Desde el punto de vista clínico, ni en medicina humana ni veterinaria parece existir una clara correspondencia entre el grado de trombocitopenia y el de hemorragia. La existencia de plaquetas mayores y más activas desde el punto de vista hemostático, en base a un mayor valor plaquetario medio en trombocitopenias inmuno-mediadas podría explicar la relativamente baja incidencia de hemorragias con un desenlace fatal (Lewis y Meyers, 1996).

---

<b>Antibióticos</b>	<b>Medicación cardiovascular</b>
Cefalotina	Digitoxina
Novobiocina	Digoxina
Oxitetraciclina	Nitroglicerina
Ristocetina	Metildopa
Estreptomicina	Levodopa
Penicilina	Hidralazina
Eritromicina	Quinidina
Meticilina	<b>Diuréticos</b>
Rifampicina	Derivados tiacínicos
<b>Agentes antimicrobianos</b>	<b>Hormonas</b>
Sulfonamidas	Estrógenos
Dinitrofenol	<b>Varios</b>
Quinina	Sulfato de protamina
<b>Arsenicales orgánicos</b>	Heparina
Dapsona	Fenobarbital
<b>Agentes antiinflamatorios</b>	Diazepan
Paracetamol	Ácido para- aminosalicílico
Ácido acetil-salicílico	Despiramina
Fenilbutazona	Sales de oro
	Clorfeniramina
	Lidocaina

---

Tabla 1. Fármacos asociados a aumento de la destrucción plaquetaria.

### 2. 3. 5.- Ehrlichiosis canina y función plaquetaria.

*Ehrlichia canis*, *E. platys*, *E. chaffensis*, *E. ewingii*, y otras especies del género *rickettsia* han sido descritas como causantes en el perro de un cuadro caracterizado por trastornos hemáticos, tendencias hemorrágicas, linfadenopatía, esplenomegalia, anomalías oculares, y otras alteraciones, menos frecuentes.

La ehrlichiosis canina cursa frecuentemente con una o más de las siguientes alteraciones hematológicas: trombocitopenia, leucopenia, anemia no regenerativa, monocitosis y linfocitosis. Además, un número considerable de pacientes manifiestan anomalías en las proteínas séricas, especialmente hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Menos frecuentemente se han descrito trombocitopatías y anemias Coombs positivas, procesos en los que, al menos en parte, intervienen factores humorales. También se ha detectado la secreción, por parte de los leucocitos afectados por *E. canis*, de un factor inhibitorio de la migración plaquetaria, diferente de los anticuerpos anti-plaquetas descritos por Waner et al. en 1995, que contribuye a la trombocitopatía. Estos factores inhiben la formación de seudópodos plaquetarios, dando lugar a células redondeadas, agrupadas y escasamente funcionales. Además, la hiperglobulinemia tiene un efecto inhibitorio sobre las capacidades migratoria y adhesiva de las plaquetas.

Si bien los pacientes afectados por estas *Rickettsias* no suelen presentar alteraciones en los test de coagulación rutinarios, la trombocitopenia y/o trombocitopatía es a veces suficientemente grave como para producir tiempos de sangrado y de retracción del coágulo anormalmente prolongados (Green, 1995). Estos pacientes trombocitopénicos suelen mostrar también un cierto número de megatrombocitos en sangre, lo que se relaciona con aumentos de actividad y megacariocitopoyética, y además presentan esplenomegalia con mayor frecuencia que los no trombocitopénicos (Pierce, 1977).

Las infecciones por *E. platys* son poco frecuentes y se caracterizan por la presentación de trombocitopenias cíclicas, que raramente presentan

sintomatología, ni siquiera la derivada de esta alteración plaquetaria (Wilson, 1992). Sin embargo, un estudio sobre agregación plaquetaria en perros con esta infección mostró signos de activación plaquetaria, evidenciados por una menor agregabilidad "in vitro" (Gaunt et al., 1990), que fue puesta de manifiesto de manera aun más concluyente por Harrus et al. en 1996, en perros infectados experimentalmente con *E. canis*.

### 2. 3. 6.- Estados urémicos y función plaquetaria.

En pacientes humanos y caninos con síndrome urémico, se ha observado una mayor tendencia a padecer hemorragias. Se ha comunicado la existencia de una disminución de la sensibilidad trombocítica a los diversos agonistas empleados en la agregación plaquetaria "in-vitro", que se corregía parcialmente tras someter al paciente humano a hemodiálisis o diálisis peritoneal. Esta disminución se comprobó que estaba relacionada con una menor capacidad secretora de AA endógeno, lo cual sugería la presencia de un inhibidor de la liberación de AA que se eliminaría parcialmente por diálisis. Además, se apreció una reducción en el contenido de ADP en las plaquetas de pacientes humanos urémicos, sugiriendo un defecto en la capacidad de almacenaje de las mismas (Di Minno et al., 1985). Sin embargo, los resultados obtenidos por Forsythe y colaboradores en 1989 no detectaron diferencias entre pacientes caninos urémicos y el lote control, planteándose la posibilidad de algún trastorno existente que no sea detectable por el método de impedancia para evaluar la agregación plaquetaria en sangre completa. De igual forma, el obtener recuentos plaquetarios significativamente más altos en los perros urémicos, podría deberse a una respuesta compensatoria por un defecto de función plaquetaria no detectado y enmascarar una deficiente agregación plaquetaria (Forsythe et al., 1989).

## 2. 4.- EFECTOS DE LA VINCRISTINA SOBRE NÚMERO Y FUNCIÓN PLAQUETARIA.

La VCR es un alcaloide obtenido de la planta *Catharantus roseus* G. Don, antes llamada *Vinca rosacea*, cuyas propiedades medicinales para tratar el escorbuto hemorrágico, dolores de muelas, heridas crónicas y diabetes son conocidas desde muy antiguo. Sin embargo, la gran importancia de este fármaco se basa en el hecho de estar dotado de importantes propiedades citotóxicas. Al igual que los restantes miembros del grupo, este alcaloide desarrolla su acción interactuando con la tubulina, que integra los microtúbulos celulares. Estos organoides juegan un importante papel en la formación del huso acromático durante la mitosis, así como en el transporte intracelular, la secreción, la neurotransmisión y el mantenimiento de la estructura celular. Los alcaloides de la vinca son también capaces de intervenir en otras actividades biológicas, al competir en el transporte intracelular de aminoácidos, en la inhibición de la síntesis de purinas, la inhibición de DNA y RNA y la síntesis proteica, así como en la inhibición de la glucólisis, la disrupción de la integridad y funciones de la membrana plasmática, etc. (Rowinsky y Donehower, 1996).

### 2. 4. 1.- Efectos cuantitativos de la VCR sobre las plaquetas.

En 1969, Robertson y McCarthy notificaron la aparición de trombocitosis en dos pacientes cancerosos en tratamiento con VCR, que no podía explicarse por el efecto de la droga sobre el proceso neoplásico. Estos investigadores fueron capaces de repetir el fenómeno experimentalmente en ratas Wistar. Este efecto de la VCR fue propuesto como tratamiento de las trombocitopenias (Choi, 1972; Yeon et al, 1974), si bien el efecto contrario ha sido también notificado (Ratzan, 1972). Subsecuentemente, el fenómeno se comprobó clínica y experimentalmente por varios grupos investigadores (Ahn et al., 1974), y se recomienda el uso clínico de la VCR en pacientes

humanos y caninos refractarios a otros tratamientos (Mackin, 1995, b; George et al, 1996). Lo más sorprendente de estas investigaciones era que la trombocitosis no era precedida por trombocitopenia y por tanto no podía ser explicada como un mecanismo compensatorio hiperreactivo a la supresión medular que el agente quimioterápico podría inducir. Más tarde se demostró que la trombocitosis era resultado de megacariocitopoyesis y trombocitopoyesis aumentadas por mecanismos entonces no clarificados (Jackson y Edwards, 1977).

Considerando los efectos nocivos de la VCR a dosis más altas que las terapéuticas, Jackson y Edwards (1977) postularon la hipótesis de que la VCR a dosis terapéuticas pudiera producir cambios plaquetarios tales que les permitiera circular libremente pero sin ser reconocidas por los mecanismos reguladores. De esta forma se detectaría una trombocitopenia funcional que aceleraría la producción plaquetaria. Los mismos autores comprobaron experimentalmente en roedores que la aparición de trombocitosis tras la administración de dosis terapéuticas de VCR era suprimida si se les administraban plaquetas normales, pero no si las plaquetas administradas habían sido tratadas previamente con VCR (Jackson y Edwards, 1977).

Los estudios de Fujisawa et al. (1993) indicaron que el aumento del número de plaquetas como respuesta a la VCR es independiente y no afecta a los niveles de AAP, lo que sugiere que este agente actúe disminuyendo la actividad eliminadora de los macrófagos, a través de los receptores Fc monocíticos. Otros proponen que la VCR altere la función fagocítica de los macrófagos disminuyendo su capacidad para ensamblar los microtúbulos. Al ser la VCR tomada rápidamente por las plaquetas (Stenberg et al, 1994), las células del SMF al fagocitarlas incluirían una dosis comparativamente alta del fármaco, con lo que se deterioraría la función fagocítica de las mismas (Mackin, 1993 b). Basados en esta hipótesis, varios investigadores emplearon plaquetas cargadas con alcaloides de la vinca en el tratamiento de la PIT humana, pero las experiencias realizadas por Helfand y cols (1984),

administrando plaquetas cargadas con VCR a pacientes caninos con TIM no dieron los resultados teóricamente esperados (Couto, 1986).

La Sociedad Americana de Hematología en una revisión reciente, concluyó que los alcaloides de la vinca pueden producir un aumento transitorio del recuento plaquetario en dos tercios de los pacientes, durante un periodo de 1 a 3 semanas de duración. Un recuento normal sostenido, que no requiera tratamiento durante al menos tres meses, ocurre en menos de un 10% de los pacientes. El único alcaloide específicamente nombrado fue la vinblastina (George et al., 1996).

Después de la primera comunicación de Green y colaboradores (1982), varios investigadores clínicos recomendaron el uso de la VCR en el tratamiento de la TIM canina en aquellos casos refractarios al tratamiento con corticosteroides, o cuando éstos estén contraindicados, si bien se recomienda observar la posible aparición de efectos secundarios (Green et al., 1982; Williams y Maggio-Price, 1984; Jans et al., 1990; Mackin, 1995 b; Fineman, 1996).

#### **2. 4. 2.- Efectos cualitativos de la vincristina en la funcionalidad plaquetaria.**

Como se mencionó de forma breve en apartados anteriores, la administración de VCR a dosis terapéuticas produce disfunciones plaquetarias tanto en humanos como en animales de experimentación. De 27 pacientes tratados con VCR y evaluados por Steinhertz et al. (1976) después de la última dosis de este fármaco, se observó una marcada reducción de la agregación plaquetaria "in vitro", que en algunos casos se prolongó hasta 4 semanas post-tratamiento. En ningún caso se observaron alteraciones de otros parámetros de la coagulación (Steinhertz et al; 1976). Stenberg y colaboradores (1995) demostraron la inducción, de forma irreversible, de alteraciones morfológicas y funcionales en plaquetas murinas tras la administración "in vivo" de VCR. Por el contrario, Mackin

## Revisión bibliográfica.

et al (1995) evaluaron, mediante el método turbidimétrico, el efecto de una sola dosis de VCR sobre la agregación plaquetaria de perros sanos sin encontrar diferencias significativas atribuibles a la administración del fármaco

### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

## Material y métodos.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad del Estado de Ohio (Estados Unidos de América). Los animales estudiados en todos los grupos fueron pacientes ambulatorios del Hospital Veterinario Docente (HVD) de la citada Universidad.

### 3. 1.- SELECCIÓN DE PACIENTES.

Para alcanzar los objetivos propuestos en nuestro estudio se establecieron 4 grupos de perros, uno de control y tres de prueba, de acuerdo con los criterios de inclusión más adelante especificados para cada uno de ellos. Estos criterios fueron cumplidos por un total de 131 perros, 21 de los cuales mostraron signos de estrés que no permitieron una venopunción limpia y precisa, por lo que no se incluyeron en el estudio. Además, otros 58 fueron excluidos por uno o más de los motivos siguientes:

- Lipemia persistente a pesar del ayuno.
- Hemólisis aparente o sospechable.
- Recuento plaquetario inferior a 200.000 plaquetas por  $\mu\text{L}$ .
- Curvas de agregación aberrantes y/o inconsistentes.

**Grupo 1.-** Los criterios para la inclusión en este grupo fueron los siguientes:

- 1.- Estado de salud normal, confirmado por examen físico y laboratorial.
- 2.- No haber recibido tratamiento alguno en las últimas 3 semanas.
- 3.- Ayuno de al menos doce horas previo a la toma de muestras.

El grupo quedó constituido por 16 perros considerados sanos. Las distribuciones de razas, edades y sexo fueron similares a las de los restantes grupos y no presentaron variaciones significativas con los mismos. Todos eran perros adultos, con edades comprendidas entre uno y once años, de ambos sexos, castrados y no castrados. El recuento plaquetario dio valores comprendidos entre 206.000 y 336.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ , con una media de 288.875 plaquetas/ $\mu\text{L}$ , que igualmente no presentó diferencias significativas al compararlas con las del resto de los grupos.

## Material y métodos.

**Grupo 2.-** Lo constituyeron seis perros, presentados al HVD y diagnosticados de cuadros inflamatorios crónicos (Tabla 2). Los criterios de inclusión en este grupo fueron:

1.- Diagnóstico clínico y/o histopatológico de un proceso inflamatorio crónico de al menos 6 semanas de duración.

2.- No haber recibido tratamiento durante al menos tres semanas previas a la toma de muestras.

3.- Ayuno de al menos doce horas previo a la toma de muestras.

Los casos 1 y 4 presentaban dos cuadros similares granulomatosos, en ambos asociados a osteomielitis, afectando a la falange proximal del dedo III en el primero, y al metacarpiano IV en el segundo. El caso 3 presentaba una peritonitis por cuerpo extraño (gasa) afectando a omentos. La peritonitis del caso 6 se localizó próxima a línea alba, en la zona centroabdominal, afectando fundamentalmente a omentos, sin que pudiera establecerse un diagnóstico etiológico definitivo. El caso n° 5 presentó una herida fistulizada desde la región costal, sin afectación ósea, que evolucionó satisfactoriamente tras resección quirúrgica en bloque. La pioderma profunda del caso n° 2 era generalizada.

n° caso	raza	edad (años)	sexo	diagnóstico	Plt/ $\mu$ L
1	Golden retriever	7	HE	Granuloma	260000
2	Mestizo	6	MC	Pioderma crónica	250000
3	Golden retriever	12	M	Peritonitis focal	340000
4	Gran danés	7	HE	Granuloma	410000
5	Caniche	16	HE	Herida fistulosa	400000
6	Border Collie	9	HE	Peritonitis focal	350000

Tabla 2. Distribución de los pacientes con cuadros inflamatorios crónicos (Grupo 2). HE = hembra esterilizada. M=macho. MC=macho castrado. Plt= Plaquetas.

## Material y métodos.

**Grupo 3.-** En el se incluyeron 21 perros con neoplasias malignas, diagnosticadas citológica o histológicamente, atendidos en el servicio de Oncología y Hematología del HVD de la UEO (Tablas 3 y 4).

Los criterios de selección en este grupo fueron los siguientes:

- 1.- Carácter de malignidad de los tumores.
- 2.- No haber sido tratado previamente el proceso tumoral con quimioterápicos.
- 3.- No haber recibido tratamiento alguno durante al menos tres semanas previas a la toma de muestras.
- 4.- Ayuno de al menos doce horas previo a la toma de muestras.

TIPO HISTOLÓGICO	Nº DE CASOS
<b>CARCINOMAS</b>	<b>7</b>
CT	1
ADC tiroideo	2
ADC hepatocel.	2
ADC mamario	2
<b>SARCOMAS</b>	<b>9</b>
HSA	4
HP	2
Sarcoma histiocítico	1
Sarcoma indiferenciado	1
Schwannoma	1
<b>N. HEMATOPOYÉTICAS</b>	<b>5</b>
LSA	1
MC	4
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>

Tabla 3. Clasificación histológica de los tumores. Leyenda: Ver Tabla 4.

Material y métodos.

nº de caso	raza	edad (años)	sexo	diagnóstico	Plt/ $\mu$ L
1	Collie	6	H	CT	390000
2	Dálmata	8	HE	Sarcoma	284000
3	Labrador retriever	11	MC	HSA	312000
4	Golden retriever	7	HE	LSA	326000
5	Shar-Pei	7	HE	HSA	200000
6	Mestizo	15	HE	MC III	290000
7	Boxer	6	H	ADC mam	340000
8	Caniche	7	HE	ADC mam	360000
9	Basset Hound	10	HE	Sarc histiocítico	326000
10	Beagle	10	HE	HP	310000
11	Mestizo	5	MC	HSA	396000
12	Golden retriever	11	HE	ADC tiroideo	460000
13	Teckel miniatura	15	MC	ADC tiroideo	379000
14	Mestizo	2	HE	ADC hepatocel.	364000
15	Mestizo	12	MC	ADC hepatocel.	338000
16	Labrador retriever	10	HE	Schwannoma mal.	298000
17	Labrador retriever	10	M	MC II	225000
18	Golden retriever	11	HE	HP	392000
19	Cocker Spaniel	10	HE	MC II	375000
20	Airedale terrier	14	HE	HSA metastático	220000
21	Golden retriever	4	MC	MC II	200000

**Tabla 4. Pacientes con neoplasias malignas (Grupo 3).** H= hembra, M= macho HE= hembra esterilizada, MC= macho castrado, Plt= plaquetas, ADC= adenocarcinoma maligno, CT= carcinoma de células transicionales, HSA= hemangiosarcoma, HP= hemangiopericitoma LSA= linfocarcinoma, MC= mastocitoma. I, II, III= grado I,II o III.

## Material y métodos.

Los dos hemangiopericitomas se consideraron malignos en base a su comportamiento. El caso n°10 tuvo que ser sometido a una amputación de la extremidad afectada al haber recidivado agresivamente tras una primera resección. Al caso n° 17 se le extirpó un primer tumor de la región carpiana derecha y, a los 2 meses, presentó una metástasis en cerebro, que se volvió a extirpar. El schwannoma fue histológicamente clasificado como maligno.

**Grupo 4.-** Lo constituyeron 8 perros con neoplasias malignas sometidos a tratamientos quimioterápicos que incluyeron VCR, sola o en combinación con otros agentes, en sus respectivos protocolos (Tabla 5). Este grupo no se sometió a comparación con los tres anteriores, sino que formó una unidad aparte, en el que cada uno de los pacientes incluidos fue comparado consigo mismo antes y una hora después de la administración de VCR.

Se seleccionaron de acuerdo a los siguientes requisitos:

- 1.- Perros con neoplasia maligna diagnosticada citológica y/o histológicamente.
- 2.- Neoplasia en fase de remisión, esto es, tras haberse producido una desaparición o reducción de la masa tumoral (Couto, 1992).
- 3.- Pacientes que hubieran recibido al menos una dosis de VCR con anterioridad al estudio.
- 4.- Animales que no tuvieran ninguna otra anomalía clínica o hematológica.
- 5.- Ayuno de al menos doce horas, previo a la toma de muestras.

Material y métodos.

n <sup>o</sup>	Raza	edad (años)	sexo	diagnóstico	protocolo
1	Golden retriever	4	HE	LSA	COAP
2	Golden retriever	7	HE	LSA	COAP
3	Pastor alemán	9	MC	HSA metastat.	VAC
4	Shetland sheepdog	11	MC	LSA GI	COAP
5	Labrador retriever	10	MC	LSA	COAP
6	Shar Pei	11	MC	LSA	COAP
7	Mestizo	9	MC	LSA	COAP
8	Pequinés	7	HE	LSA	COAP

**Tabla 5. Pacientes incluidos en el Grupo 4.** HE=hembra esterilizada, MC=macho castrado, HSA= hemangiosarcoma, LSA linfoma, COAP= ciclofosfamida, vincristina, arabinósido de citosina y prednisona, VAC=vincristina, doxorubicina y ciclofosfamida.

### 3. 2.- MATERIAL Y METODOLOGÍA EMPLEADOS (GRUPOS 1, 2 Y 3)

a) **Toma de muestras.** A cada uno de los animales se les extrajo al menos 4'5 ml de sangre de una vena yugular, poniendo especial cuidado en realizar una punción limpia y no someter a estrés al paciente durante el proceso. No obstante, si la manipulación necesaria producía excitación o temor evidente, el paciente era excluido del presente estudio. La sangre se obtuvo con una jeringa de polipropileno de 6 ml y una aguja de 20 G (Monoject, Sherwood Medical, St. Louis, MO, EE UU). La muestra así obtenida se depositó cuidadosamente en un tubo de cristal con 0,5 ml de citrato sódico al 3,8% (Venoject, Terumo, Elkton, Md, EE UU).

b) **Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP).** Una vez obtenida, la muestra se centrifugó a 900 rpm durante 5 minutos, con una centrifugación adicional de dos minutos a 1100 rpm si aun había hematíes visibles en la capa superior. A continuación el sobrenadante era cuidadosamente extraído con una pipeta de puntas desechables de polipropileno, y transferido a un tubo de polistireno con tapa, donde se dejaba reposar durante una hora a temperatura ambiente.

c) **Obtención de plasma pobre en plaquetas (PPP).** Una vez extraído el PRP, el resto de la muestra era nuevamente centrifugado, ahora a 3000 rpm, durante 20 minutos, y el sobrenadante era igualmente almacenado en un tubo de polistireno.

d) **Recuento plaquetario.** Cada muestra de PRP fue sometida a recuento plaquetario en un hemocitómetro de Neubauer modificado y un microscopio de contraste de fase, empleando además un sistema manual de dilución (Unopette, Becton and Dickinson, Rutherford, New Jersey, EE UU).

e) **Método de agregación plaquetaria.** La agregación se realizó utilizando un método turbidimétrico en un agregómetro de 4 canales y autocalibrable PAP-4 Platelet Aggregation Profiler (Bio-Data Corporation, Horsham, PA, EE UU), siguiendo las instrucciones del fabricante. La

## Material y métodos.

velocidad de rotación de los pocillos se ajustó a 900 rpm y se colocaron 200  $\mu$ L alícuotas de PRP en 3 tubos de cristal de fondo plano siliconizados ( Bio-Data Corp., Horsham, PA, EE UU). En los mismos se dejó incubar la muestra a 37° C durante 3-5 minutos. Seguidamente, se colocaron 200 $\mu$ L de PPP en otro tubo de iguales características con el fin de establecer los datos de referencia de agregación al 100%. A continuación, se colocó una barrita agitadora imantada y siliconizada en cada uno de los 3 tubos de PRP, que se insertaron en los pocillos del agregómetro donde previamente se habían colocado microadaptadores para tubos pequeños.

La agregación se indujo usando 20  $\mu$ L de cada uno de los siguientes agonistas: ADP a una concentración  $2 \times 10^{-4}$  M, COL a una concentración de 0,19 mg/ml y AA a una concentración de 5 mg/ml, todos ellos obtenidos comercialmente (Bio-Data Corp., Horsham, PA, EE UU). El patrón de agregación se obtuvo durante al menos 10 minutos. Siempre que la muestra lo permitió, la prueba se repetía al menos una vez, excluyéndose del estudio aquellas que presentaron patrones de agregación claramente diferentes entre las repeticiones.

**f) Parámetros estudiados.** Se estudiaron los siguientes parámetros: Mitad del tiempo transcurrido desde la adición de cada agonista hasta la agregación máxima ( $1/2 T Ag Max$ ); pendiente, número sin unidad calculado por el agregómetro y agregación máxima obtenida ( $Ag Max$ ), expresada en tantos por ciento del incremento de transmisión de luz a través de la muestra.

### 3. 3.- MATERIAL Y METODOLOGÍA ESPECÍFICOS DEL GRUPO 4.

En el caso de los perros incluidos en el grupo 4, una vez realizado el examen físico y obtenidos los resultados del hemograma, en los que no se detectaron anomalías en ninguno de ellos, se extrajo la primera muestra de sangre (Pre VCR) de acuerdo al punto a) del apartado anterior. A continuación, se le administró a cada paciente una dosis de 0.5 mg/m<sup>2</sup> de VCR (Oncovin, Elly Lilly and Company, Indianapolis, IN, EE UU) en un bolo vía intravenosa, utilizando una vena cefálica. Una hora más tarde se procedió a tomar la segunda muestra (Post VCR) siguiendo el procedimiento antes descrito. Con ambos grupos de muestras se siguieron los mismos pasos [del b) al f)] del apartado anterior.

### 3. 4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

#### 3. 4. 1.- Grupos 1, 2 y 3.

Para aquellas variables que presentaron una distribución normal, dentro de cada grupo de pacientes se estimaron medias y desviaciones estándar para cada uno de dichos grupos. Se determinaron asimismo intervalos de confianza al 95% para las medias. Para comparar a estas últimas se utilizó el contraste de la F correspondiente al análisis de la varianza a una vía. Cuando el contraste fue significativo, se analizaron las diferencias por parejas utilizando el test de Tuckey de comparaciones múltiples. En aquellos casos en que no hubo normalidad, y esta tampoco fue alcanzada con la transformación logarítmica de los datos, se analizaron los datos mediante métodos no paramétricos. En cada grupo se estimó la mediana y los percentiles 25 y 75. Se compararon finalmente las distribuciones mediante el test de Kruskal-Wallis. En todos los casos se consideró que las diferencias eran significativas cuando  $P \leq 0.05$ .

#### 3. 4. 2.- Grupo 4.

Cada grupo de resultados, antes y después de la adición de VCR, fue sometido a una prueba de normalidad. Aquellos datos que presentaron distribución normal se analizaron con una prueba t pareada. Los restantes resultados, que no estaban normalmente distribuidos, se analizaron mediante una prueba de Wilcoxon. En todos los casos se consideró que las diferencias eran significativas cuando  $P < 0.05$ .

## 4.- RESULTADOS

Resultados.

#### 4. 1.- RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS GRUPOS 1, 2 Y 3:

Se evaluaron en total 43 perros. Dieciséis pertenecientes al grupo 1 o de control y considerados sanos, seis al grupo 2, con enfermedades inflamatorias crónicas y 21 con neoplasias malignas, que integraban el grupo 3. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad y sexo entre los 3 grupos.

El parámetro empleado para medir la intensidad de la reacción fue la **agregación máxima (Ag Max)**, expresada en tantos por ciento del incremento en la transmisión que experimenta un haz de luz que atraviesa la muestra durante la fase de agregación. Se la consideró positiva siempre que el valor obtenido superase el 10%. La velocidad y ritmo de producción de la reacción se evaluaron mediante la **pendiente** de la curva de agregación, número carente de unidad calculado automáticamente por el agregómetro, y el tiempo transcurrido hasta que la agregación llegara a la mitad de su intensidad máxima (**1/2 T Ag. Max.**), expresado en minutos.

Los valores obtenidos fueron comparados entre sí por los procedimientos estadísticos descritos en la sección de Material y Métodos. Además, los **recuentos plaquetarios** obtenidos de cada muestra, también fueron analizados estadísticamente. Se consideró un resultado estadísticamente significativo cuando  $P \leq 0'05$ .

En cada variable fue calculada la **potencia**, esto es, la probabilidad de detectar diferencias entre los grupos estudiados, expresada en tantos por ciento. En todos los casos en que el valor de la potencia es inferior a 0'800, los resultados negativos deben evaluarse cuidadosamente.

Los resultados obtenidos se describen en las Tablas 6 y 7.

Resultados.

Parámetro		Mediana	P 25	P 75	P-valor
Ag Max %	Grupo 1	67'000	30'000	80'000	
ADP	Grupo 2	87'500	60'000	100'000	0'130
	Grupo 3	53'000	34'250	75'000	
Ag Max %	Grupo 1	31'000	2'000	74,500	
COL	Grupo 2	78'000	18'000	90'000	0'311
	Grupo 3	70'000	6'500	76'000	
Ag Max %	Grupo 1	16'000	4'000	45'000	
AA	Grupo 2	35'000	5'000	100'000	0'641
	Grupo 3	12'000	4'750	20'000	
Pendiente	Grupo 1	36'500	27'000	40'500	
ADP	Grupo 2	44'000	28'000	84'000	0'332
	Grupo 3	29'000	25'750	40'500	
Pendiente	Grupo 1	10'000	3,500	20'500	
COL	Grupo 2	20'500	4'00	31'000	0'478
	Grupo 3	19'000	4'00	33'250	
1/2 T Ag Max	Grupo 1	0'300	0'150	0'300	
ADP	Grupo 2	0'250	0'150	0'300	0'994
	Grupo 3	0'220	0'150	0'300	
1/2 T Ag Max	Grupo 1	3'000	0'100	4'225	
COL	Grupo 2	3'225	1'300	3'450	0'818
	Grupo 3	2'450	0'300	3'588	
1/2 T Ag Max	Grupo 1	0'300	0'150	0'300	
AA	Grupo 2	0'300	0'300	0'450	0'406
	Grupo 3	0'200	0'137	0'450	

Tabla 6. Datos no paramétricos obtenidos de los grupos 1, 2 y 3. P 25= percentil 25; P 75= Percentil 75. P-valor correspondiente a la prueba de Kruskal-Wallis.

#### 4. 1. 1.- Agregación máxima

a) **ADP.**- Las plaquetas de todos los animales estudiados agregaron en presencia del ADP (Ag Max > 10%), aunque la intensidad con que se produjo esta fue muy variable entre los miembros de los 3 grupos. Tres de los perros del grupo 2 (50%) presentaron agregación máxima (100%), fenómeno que solo se observó en otro perro, perteneciente al grupo 3. Veintitrés de las muestras (53'48%) agregaron por encima del 50% (Tabla 6 y Gráfica 1). No hubo diferencias significativas entre los 3 grupos ( $P=0'130$ ). La potencia para esta constante fue de 0'279.

b) **COL.**- Siete muestras procedentes de perros del grupo 1 (43'75%) y otras siete del grupo 3 (33'33%) no respondieron al COL (Ag Max < 10%), observándose este hecho en una sola muestra del grupo 2 (16'66%). Dos muestras del grupo 3 (9'52%) y una del grupo 2 (16'66%) mostraron el 100% de agregación frente a este agonista. Se obtuvo una agregación superior al 50% para 24 muestras (55'81%) del total (Tabla 6 y Gráfica 2). Las diferencias existentes entre los 3 grupos no fueron estadísticamente significativas ( $P=0'311$ ). El valor de la potencia fue de 0'066.

c) **AA.**- La respuesta fue en general más escasa frente al AA, en donde las plaquetas de seis pacientes del grupo 1 (37'5%), dos pacientes del grupo 2 (33'33%) y ocho del grupo 3 (38'09%) no agregaron al ser estimuladas por este agonista. Dos de las muestras procedentes del grupo 2 (33'33%) y una del grupo 3 (4'76%) reaccionaron con la máxima intensidad al AA. Solo diez pacientes del total de los evaluados (23'25%) en los tres grupos agregaron por encima del 50% (Tabla 6 y Gráfica 3). No hubo diferencias estadísticamente significativas  $P=(0'641)$ . La potencia obtenida con esta variable fue de 0'177.

#### 4. 1. 2.- Pendiente.

a) **ADP.**- La pendiente para este agonista no tuvo valores superiores a 50 para las plaquetas procedentes de individuos del grupo 1, pero sí para las de tres pacientes (50%) del grupo 2 y otros 3 del grupo 3 (14'28%) (Tabla 6 y

Resultados.

**Gráfica 4).** Sin embargo las diferencias reseñadas carecieron de significación estadística ( $P=0'332$ ). La potencia dio un valor de  $0'349$ .

**b) COL.-** Las curvas obtenidas (**Pendiente COL**) tras la adición de este agonista son más irregulares que en el caso anterior (**Tabla 6 y Gráfica 5**), y tampoco presentan significación estadística ( $P=0'478$ ), con un valor de la potencia de  $0'082$ .

**c) AA.-** En este caso, las plaquetas procedentes de los pacientes del grupo 2 (valor de la media= $1'468$ ) mostraron un ritmo de agregación (**Pendiente AA**) más alto que las del grupo 3 (valor de la media= $0'968$ ). Las muestras del grupo 1 tomaron un valor intermedio con respecto a los dos anteriores (valor de la media= $1'196$ ) (**Tabla 7 y Gráfica 6**). El análisis de la varianza demostró que existen diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los resultados de los tres ( $P=0'029$ ). Al efectuar el Test de Tuckey a estos tres grupos de resultados, solo se obtuvo significación estadística al comparar el 2 y el 3. El valor de la potencia para esta variable fue de  $0'524$ .

#### 4. 1. 3.- Tiempo hasta la mitad de la agregación máxima.

**a) ADP.-** Todas las muestras agregaron rápidamente, en un tiempo ( **$1/2 T Ag Max ADP$** ) inferior a medio minuto, exceptuando una del grupo 1 ( $6'25\%$ ), una del grupo 2 ( $16'66\%$ ) y otra del grupo 3 ( $4'76\%$ ) (**Tabla 6 y Gráfica 7**). Las diferencias entre los 3 grupos no fueron significativas ( $P=0'994$ ). La potencia tuvo un valor de  $0'049$ .

**b) COL.-** Con este agonista, la reacción plaquetaria ( **$1/2 T Max Ag COL$** ) fue mucho más lenta en la mayoría de los casos. Las plaquetas de nueve perros del grupo 1 ( $56'25\%$ ) necesitaron más de 3 minutos para agregar, y lo mismo ocurrió con cuatro del grupo 2 ( $66'66\%$ ) y con diez del grupo 3 ( $47'61\%$ ) (**Tabla 6 y Gráfica 8**). De nuevo no hubo significación estadística ( $P=0'818$ ).

Resultados.

c) AA.- Todos los animales del grupo 1 (100%) agregaron en menos de medio minuto (1/2 T Max Ag AA). Un solo paciente del grupo 2 (16'66%) y cuatro del grupo 3 (19'04%) tenían plaquetas que necesitaron más de este tiempo para reaccionar (Tabla 6 y Gráfica 9). No hubo significación estadística (P=0'406). El valor de la potencia fue de 0'083.

Parámetro		Media	Desv. Estándar	Intervalo de confianza	P-valor
Recuento plaquet.	Grupo 1	288.875	71.262	253.243 - 324.505	0'106
	Grupo 2	336.666	69.761	279.706 - 393.626	
	Grupo 3	335.000	61.595	306.738 - 363.261	
Pendiente AA	Grupo 1	1'196	0'357	1'0116 - 1'3804	0'029
	Grupo 2	1'468	0'447	1'104 - 1'832	
	Grupo 3	0'986	0'392	0'8108 - 1'1612	

Tabla 7. Datos paramétricos de los grupos 1, 2 y 3.

Los recuentos plaquetarios de cada uno de los grupos no presentaron diferencias significativas entre sí (Tabla 7 y Gráfica 10), y los intervalos de confianza aparecen parcialmente solapados, por lo este parámetro no parece presentar ninguna característica específica respecto a los procesos estudiados.

Resultados.

#### 4. 2.- RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL GRUPO 4.

Se evaluaron los mismos parámetros de la agregación plaquetaria "in vitro" que en el caso anterior, así como los recuentos plaquetarios, de ocho perros con neoplasias malignas, antes y una hora después de la administración de VCR a dosis terapéuticas.

Los datos obtenidos en el grupo 4 se describen en las Tablas 8 y 9.

Parametro	Pre VCR	Pre VCR	Pre VCR	Post VCR	Post VCR	Post VCR	P valor
	Media	Desv. estándar	Intervalo de confianza	Media	Desv. estándar	Intervalo de confianza	
Ag Max ADP	65'375	31'731	42'937 - 88'813	38'500	27'318	16'062 - 48'158	0'002
Ag Max COL	55'125	42'820	32'642 - 85'403	27'625	31'825	5'121 - 50'129	0'060
Ag Max AA	71'750	30'876	49'928 - 93'582	42'875	29'181	22'133 - 63'617	0'013
Pendiente ADP	52.750	29'827	31'660 - 73'840	28,375	11'463	20'269 - 36'491	0'032
Pendiente COL	55'125	42'820	24'847 - 85'403	20'500	21'112	5'572 - 35'429	0'026
Pendiente AA	31'625	32'867	9'105 - 54'145	17'125	11'765	8'807 - 25'443	0'138
1/2 T Ag Max COL	1'026	1'087	0'438 - 1'974	0'725	0'738	0'203 - 1'247	0'094
Recuento Plaquet	285.625'000	74.084	233.239 - 338.010	321875	87.615	259921 - 383.828	0'090

Tabla 8 . Datos paramétricos del grupo 4.

## Resultados.

Parámetro	Pre VCR	Pre	Pre	Post	Post	Post	P-
	Mediana	P 25	P 75	Mediana	P 25	P 75	valor
1/2 T Ag Max ADP	0'225	0'150	0'650	0'225	0'150	0'300	0'625
1/2 T Ag Max AA	0'375	0'150	0'725	0'373	0'150	0'725	0'945

Tabla 9. Datos no paramétricos del grupo 4.

### 4. 2. 1.- Agregación máxima.

a) ADP.- Las plaquetas de todos los pacientes del grupo agregaron frente a este agonista antes de la administración de VCR (Ag Max ADP Pre VCR > 10%), hecho que no se produjo en dos de ellos en la medición Post VCR. Excepto en el paciente n° 8, que no experimentó cambios, todos los animales evaluados mostraron una clara reducción en la intensidad con que agregaron sus plaquetas frente a este agonista, tras recibir su correspondiente dosis de VCR (Tabla 8 y Gráfica 11). Dicha reducción tuvo una clara significación estadística ( $P=0'002$ ).

b) COL.- Tras la adición de este agonista, dos de las muestras (pacientes 2 y 8) no agregaron antes ni después de la administración de VCR. Otras dos, que sí presentaron agregación Pre VCR, mostraron una completa inhibición del proceso tras recibir los pacientes el fármaco en cuestión. En el resto de las muestras analizadas también se observó un mayor o menor grado de reducción en el porcentaje agregatorio Post VCR con respecto al Pre VCR (Tabla 8 y Gráfica 12). Sin embargo, no se obtuvo significación estadística al comparar los resultados ( $P=0'060$ ). La potencia tuvo un valor de 0'568.

c) AA.- Nuevamente, las plaquetas de todos los pacientes del grupo agregaron frente a este agonista (en seis de los casos por encima del 50%) y en todos ellos, exceptuando otra vez al n° 8, se produjo una clara reducción en la intensidad de la reacción. En dos de ellos (1 y 2) ocurrió que Ag Max Post

Resultados.

VCR<10% (Tabla 8 y Gráfica 13). Las diferencias apreciadas fueron significativas ( $P=0'013$ ).

#### 4. 2. 2.- Pendiente.

a) ADP.- El ritmo de reacción de las plaquetas tras la adición del agonista en cuestión se redujo en todos los casos, en algunos de forma notable (5 y 7), y guardando gran semejanza con la reducción experimentada por el porcentaje de agregación máxima (Tabla 8 y Gráfica 14). Las diferencias obtenidas fueron estadísticamente significativas ( $P=0'032$ ).

b) COL.- Aquellos pacientes que reaccionaron positivamente a la adición de COL (todos excepto nº 2 y nº 8) redujeron notablemente su ritmo de reacción a este agonista en las muestras tomadas tras la administración de VCR (Tabla 8 y Gráfica 15). Esta reducción fue significativa ( $P=0'026$ ).

c) AA.- Cinco de las muestras Post VCR (1, 3, 4, 5 y 7) disminuyeron su ritmo de agregación en relación a las Pre VCR, dos (2 y 8) lo aumentaron muy ligeramente, y una (6) no experimentó cambios (Tabla 8 y Gráfica 16). Las diferencias reseñadas no fueron significativas ( $P= 0'138$ ).

#### 4. 2. 3.- Tiempo hasta la mitad de la agregación máxima.

a) ADP.- El tiempo de agregación se redujo en 3 de los pacientes (1, 2 y 6), especialmente en el nº 2 en el que, de un minuto en la toma Pre VCR pasó a 15 sgs en la Post VCR, se mantuvo constante en tres de ellos (3, 7 y 8), y aumentó levemente en los dos restantes (4 y 5) (Tabla 9 y Gráfica 17). No se obtuvo significación estadística ( $P=0'094$ ).

b) COL.- En este caso el tiempo de agregación se redujo en cinco de las muestras (1, 2, 3, 4 y 7), en grado variable. Una no presentó cambios (8) y las dos restantes experimentaron un ligero aumento (Tabla 8 y Gráfica 18). El estudio careció de significación estadística ( $P= 0'625$ ).

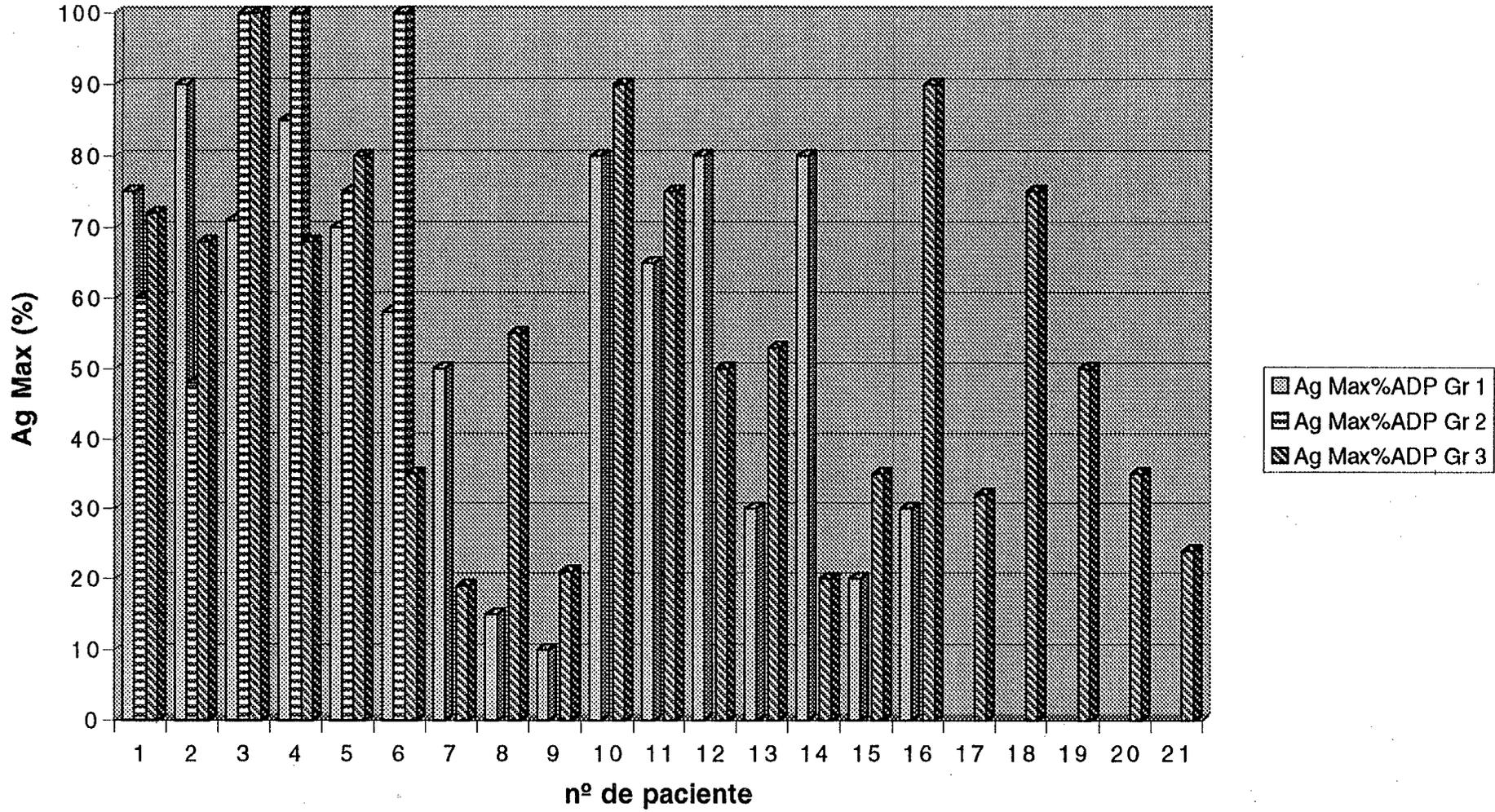
## Resultados.

c) **AA.-** Las plaquetas de cinco de los pacientes (1, 2, 4, 6 y 7) mostraron una cierta reducción en el tiempo de agregación, que en el caso n° 1 pasó de 7'8 minutos a reaccionar de forma inmediata. Los tres restantes prolongaron el tiempo de agregación de forma moderada, exceptuando el paciente n° 3, cuyas plaquetas pasaron de un 1/2 T Ag Max Pre VCR= 0'3 min a uno de 7 min Post VCR (Tabla 9 y Gráfica 19). Los resultados no fueron estadísticamente significativos (P= 0'945).

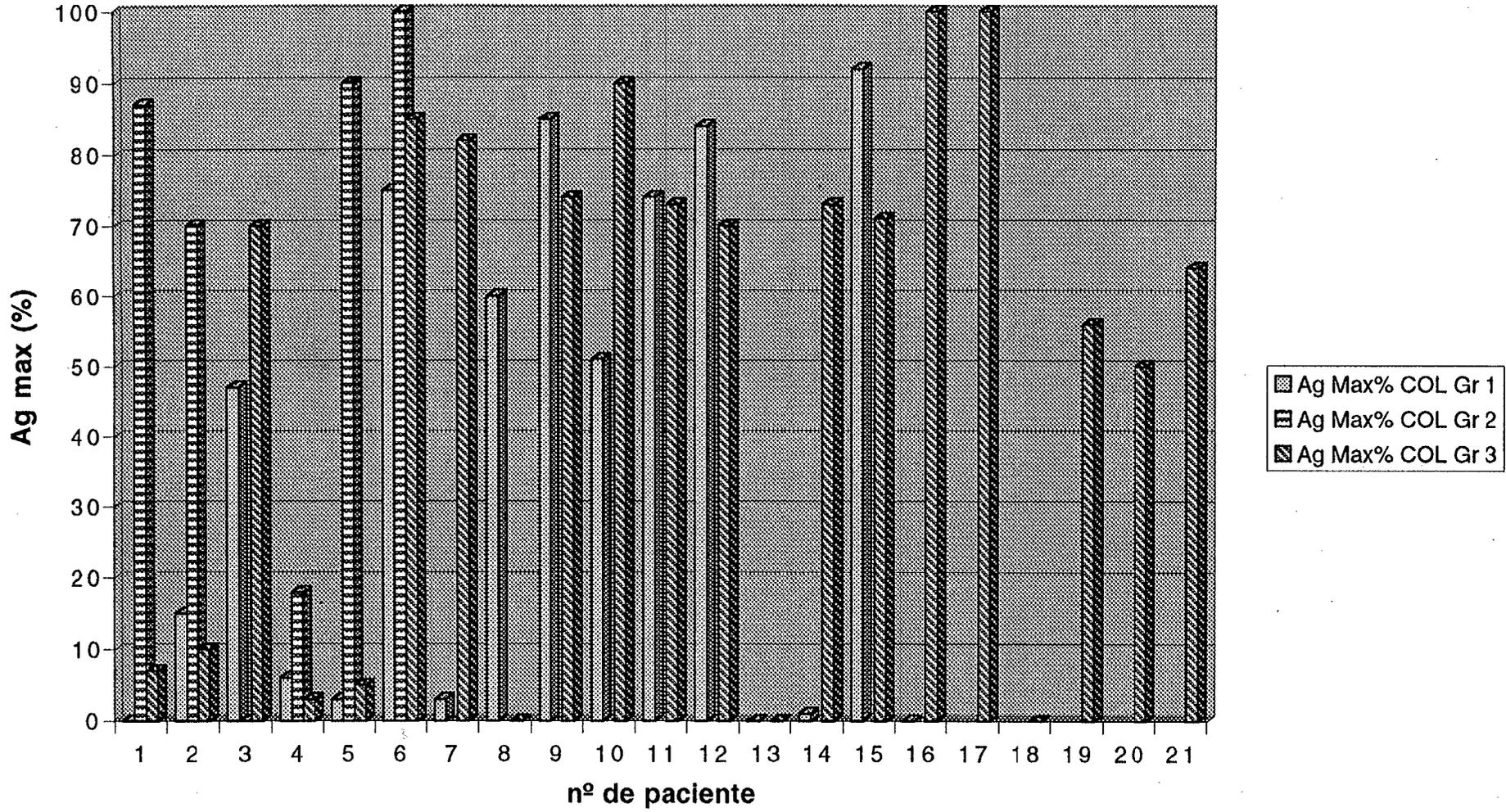
### 4. 2. 4.- Recuentos plaquetarios.-

Exceptuando al paciente n° 3, que experimentó un pequeño descenso (de 262.000 Pre VCR a 253.000 Post VCR), los restantes animales experimentaron un moderado a ligero aumento en el recuento de estos elementos formes (Tabla 8 y Gráfica 20), que no fue estadísticamente significativo (P= 0'090).

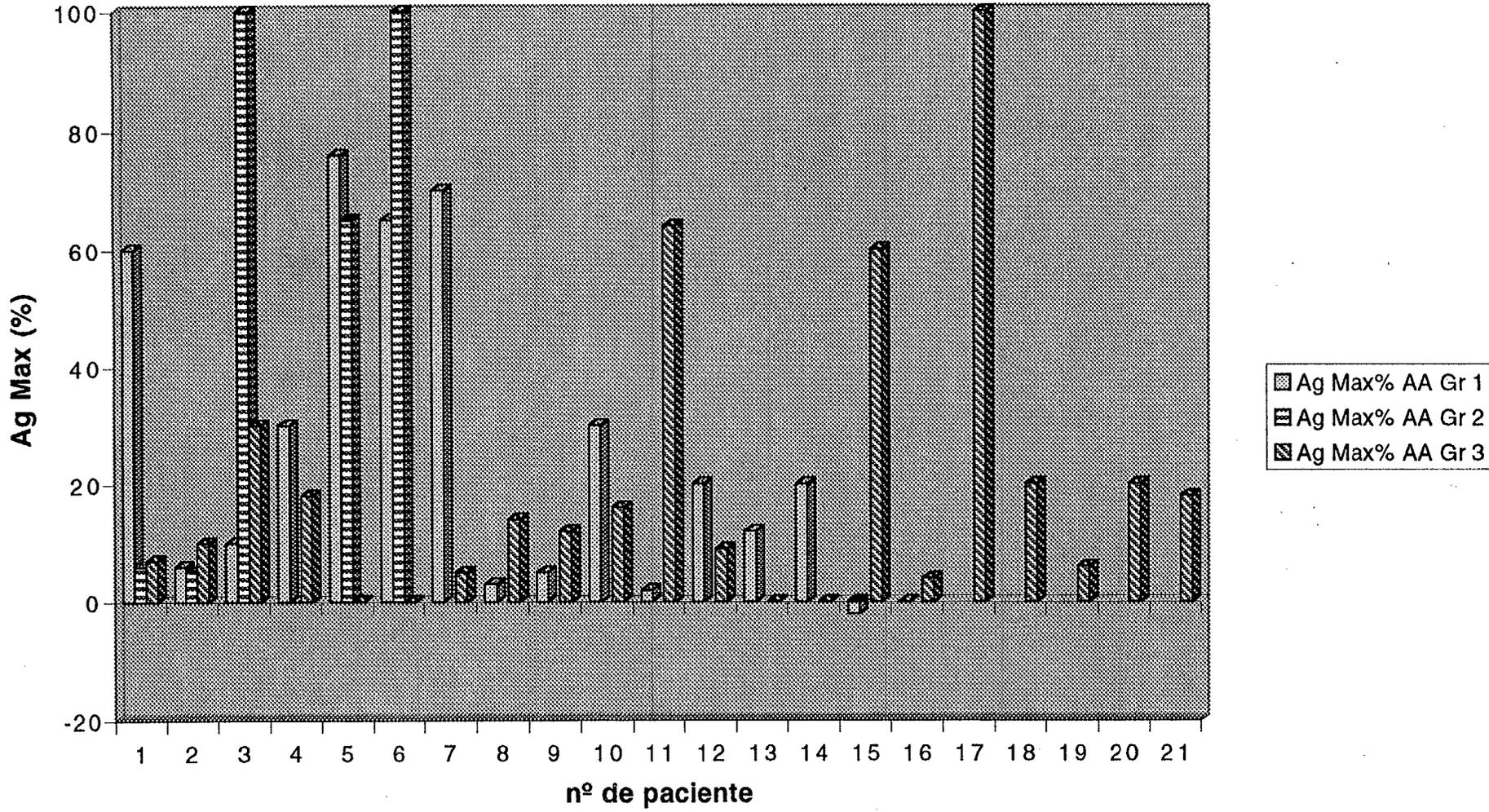
Gráfica 1: Agregación máxima en respuesta al ADP



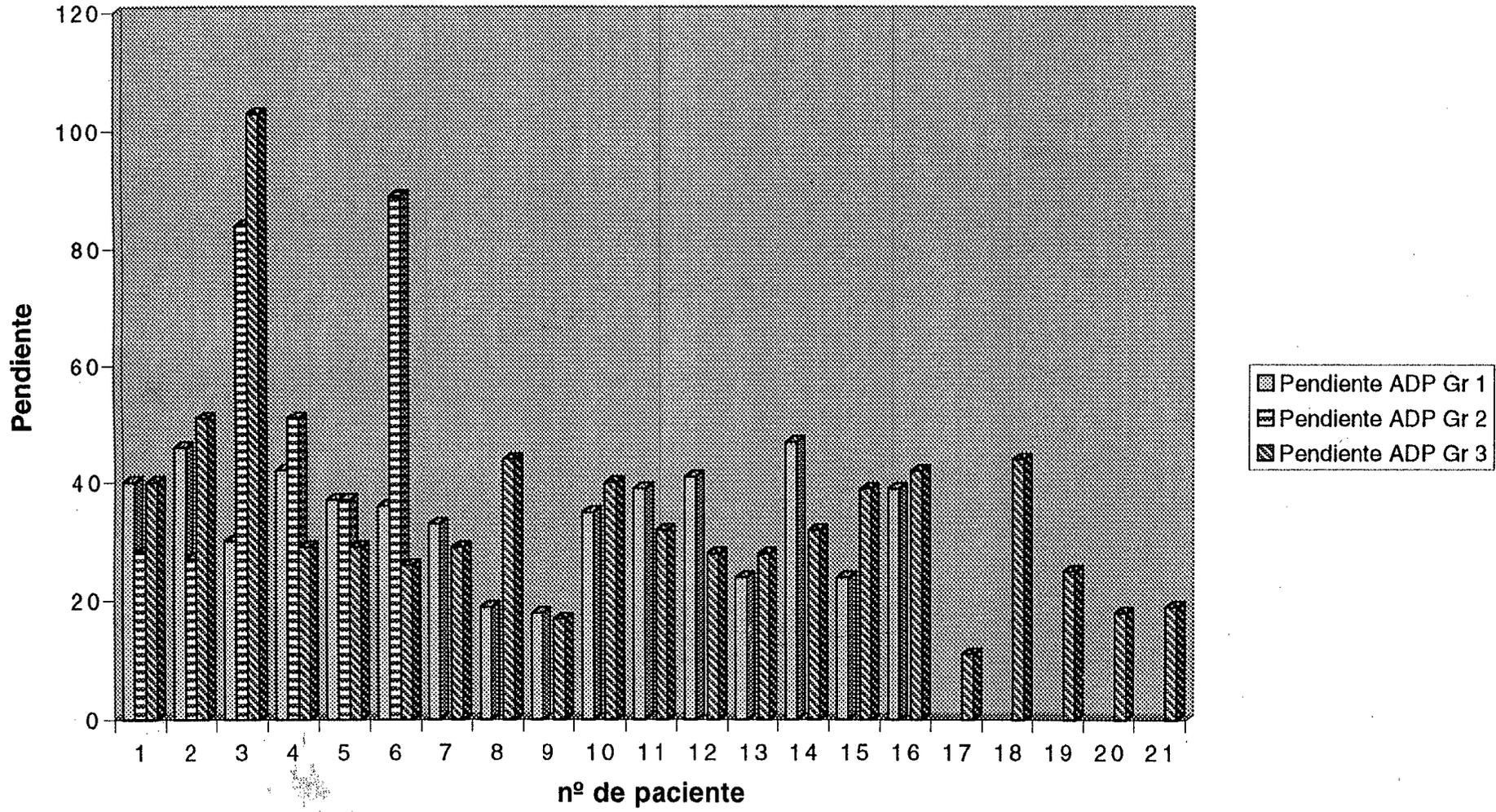
Gráfica 2: Agregación máxima en respuesta al COL



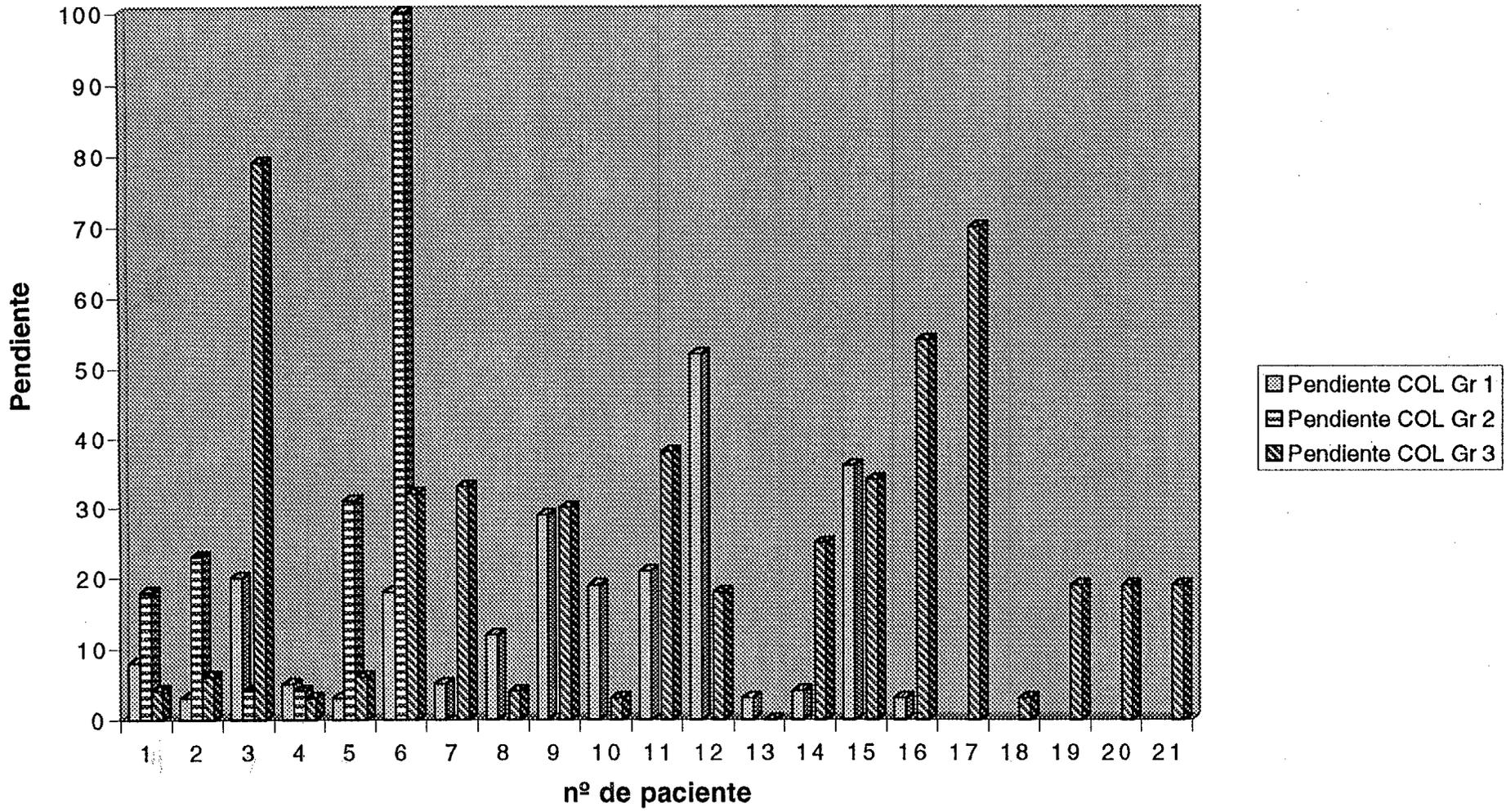
Gráfica 3: Agregación máxima en respuesta al AA



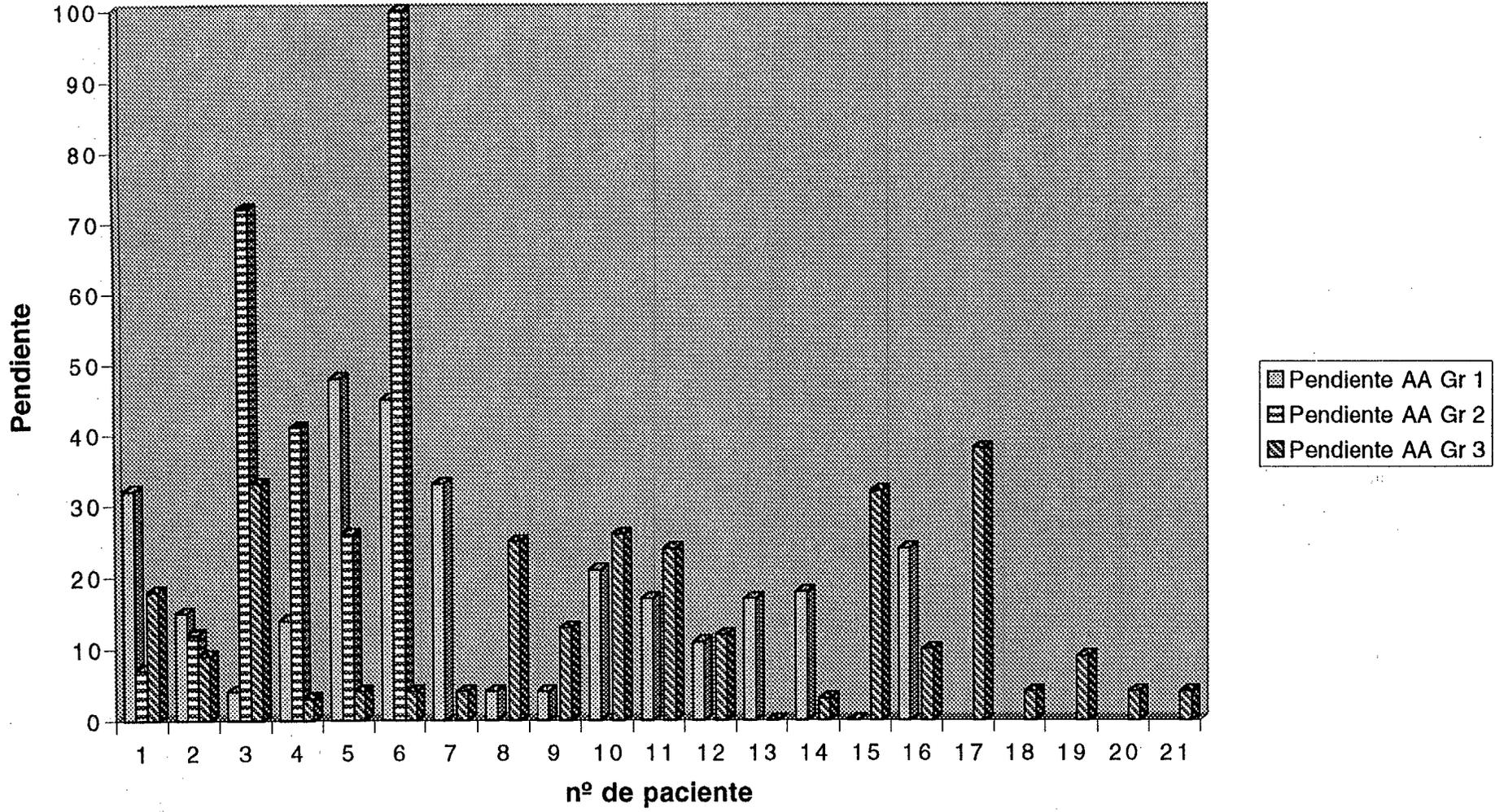
Gráfica 4: Pendiente en respuesta al ADP.



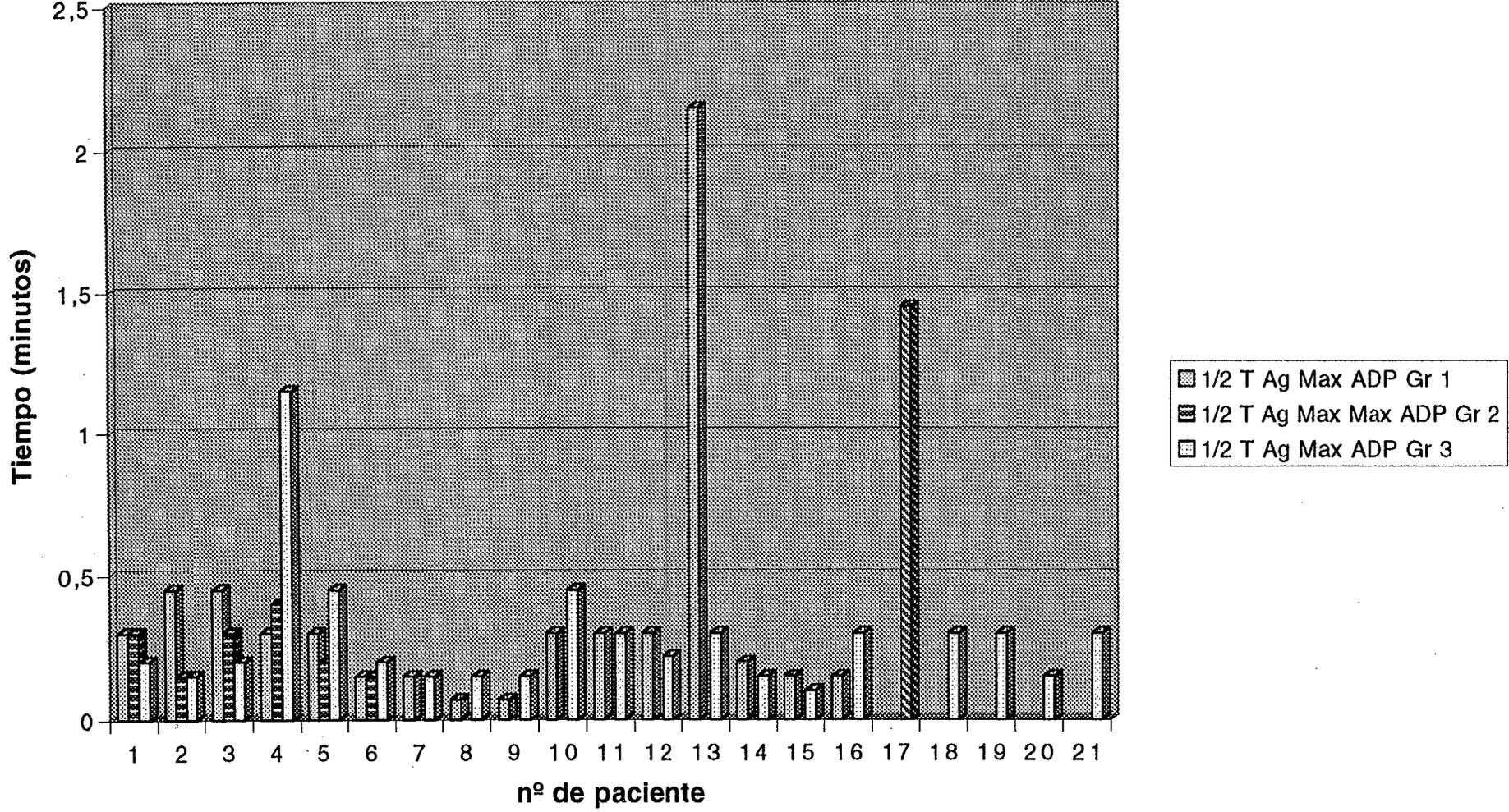
Gráfica 5: Pendiente en respuesta al COL



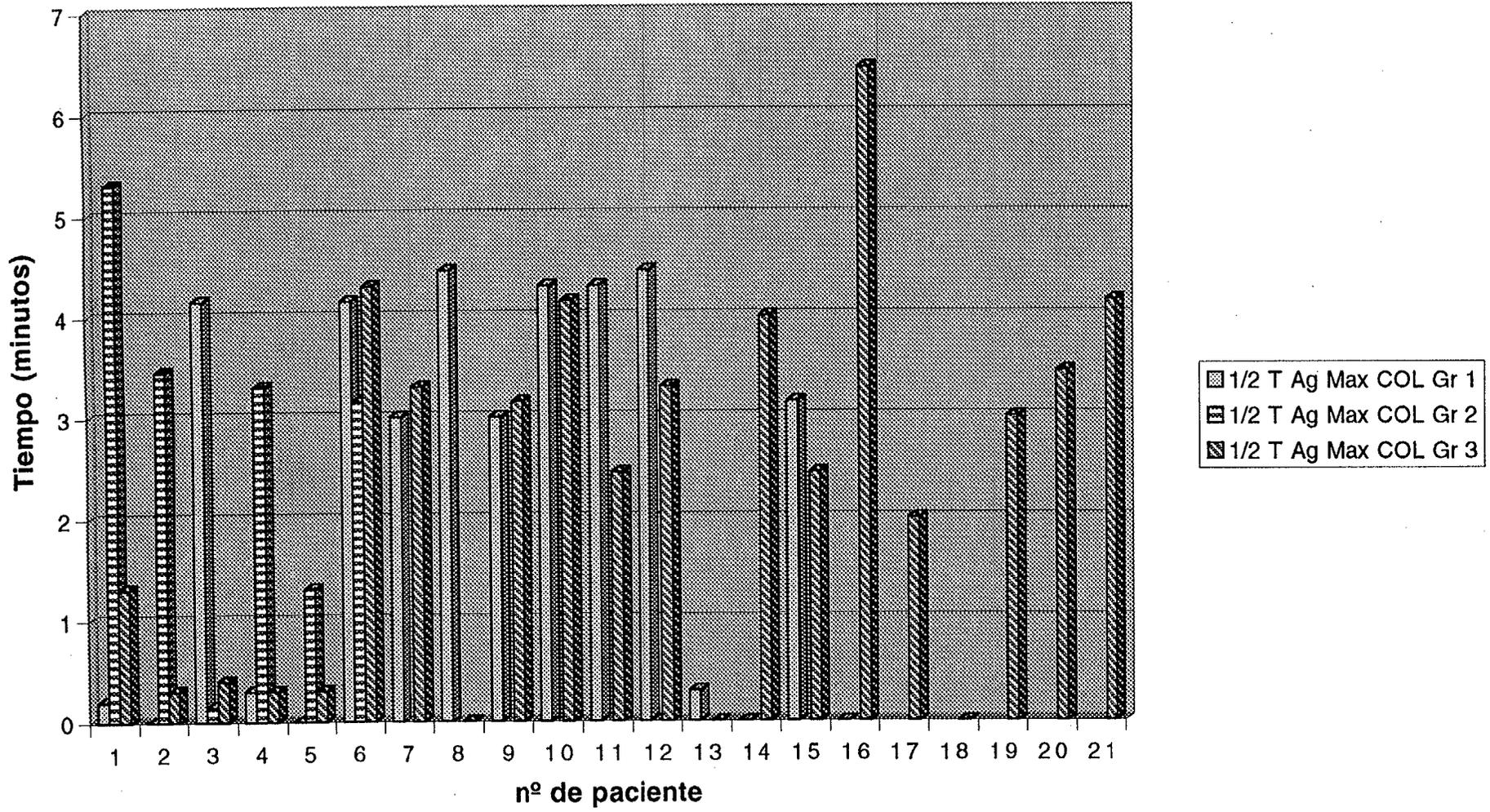
Gráfica 6: Pendiente en respuesta al AA



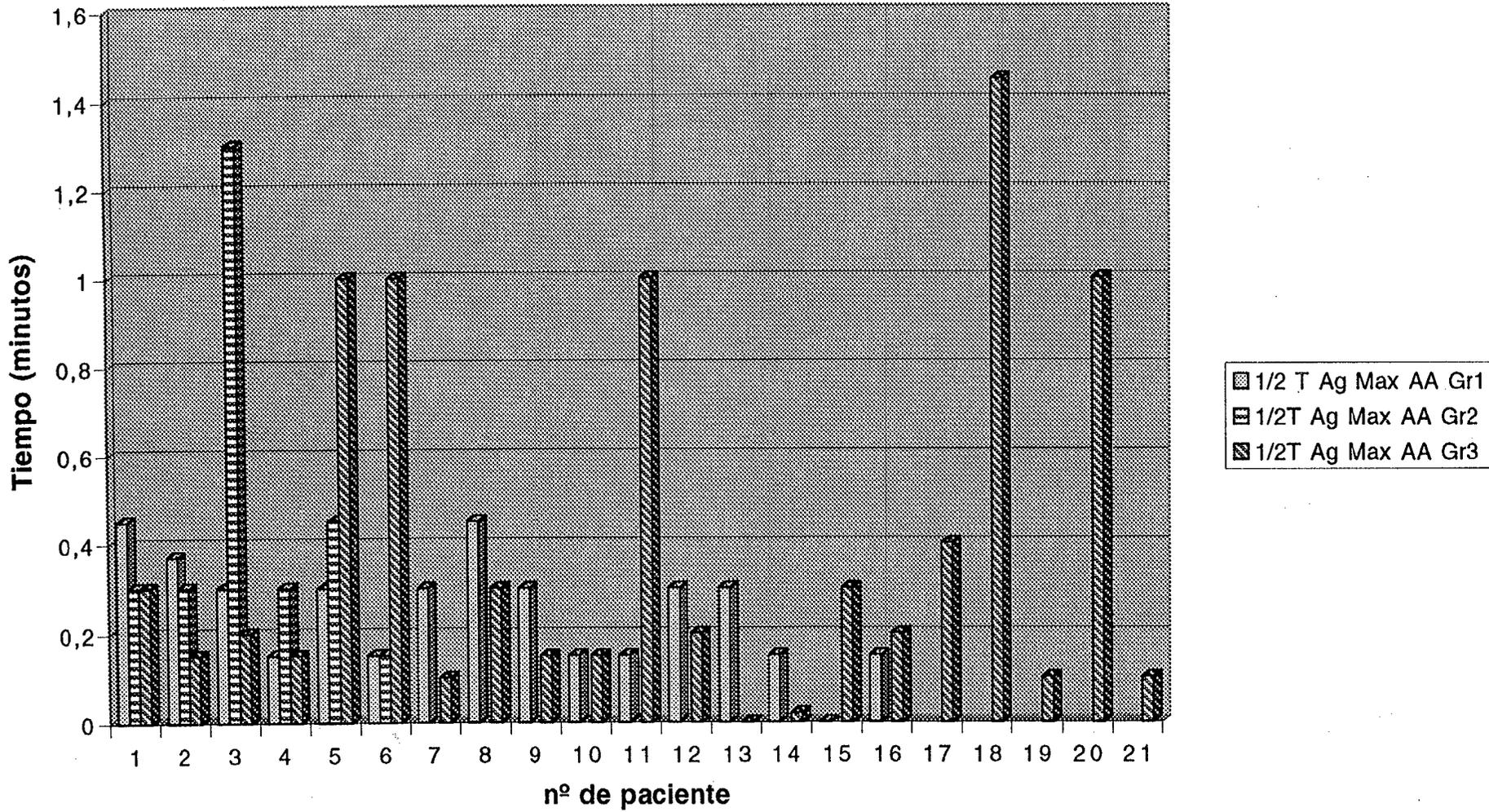
Gráfica 7:1/2 Tiempo hasta Ag Max en respuesta a ADP



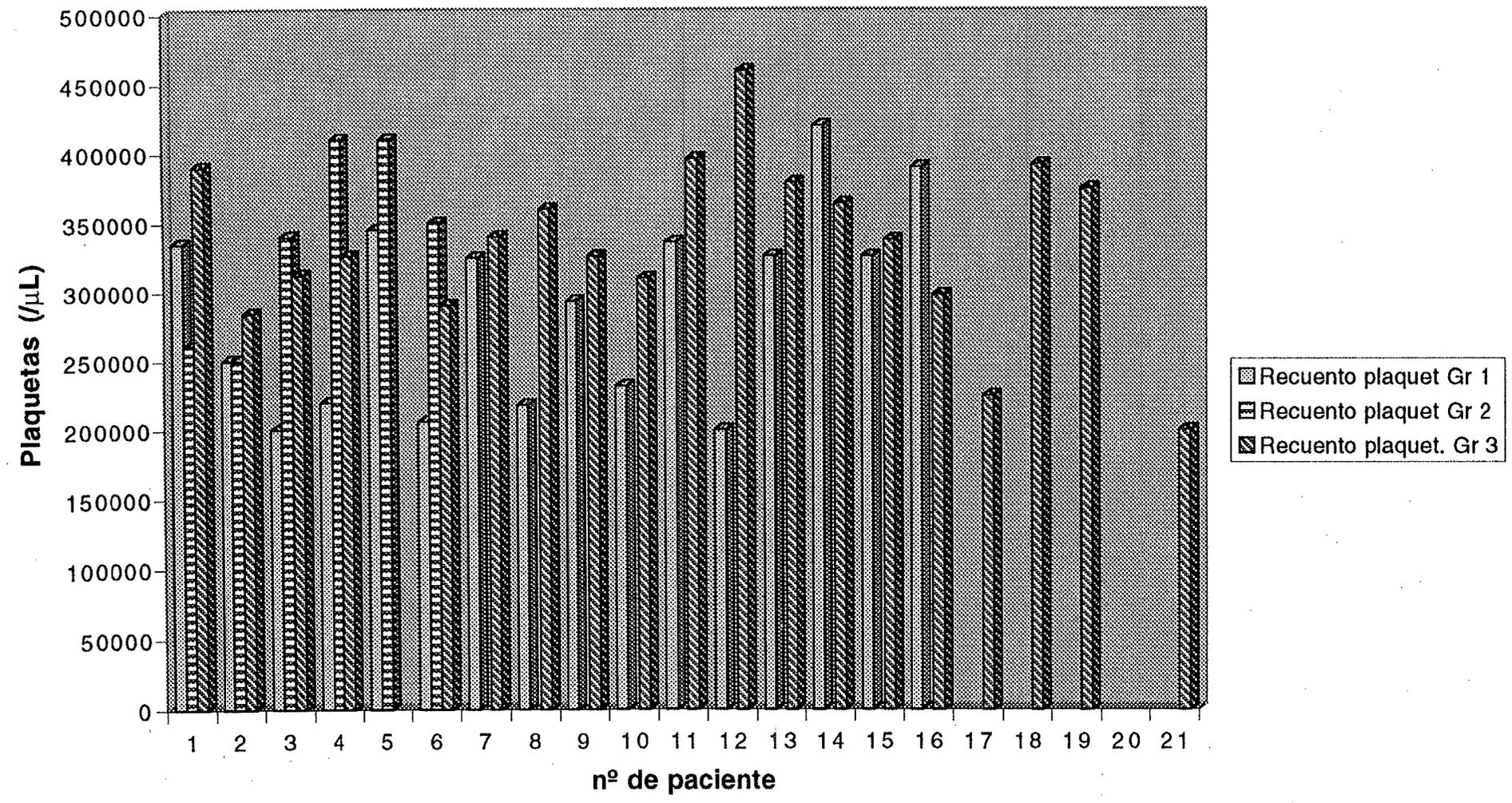
Gráfica 8: 1/2 Tiempo hasta Ag Max en respuesta a COL



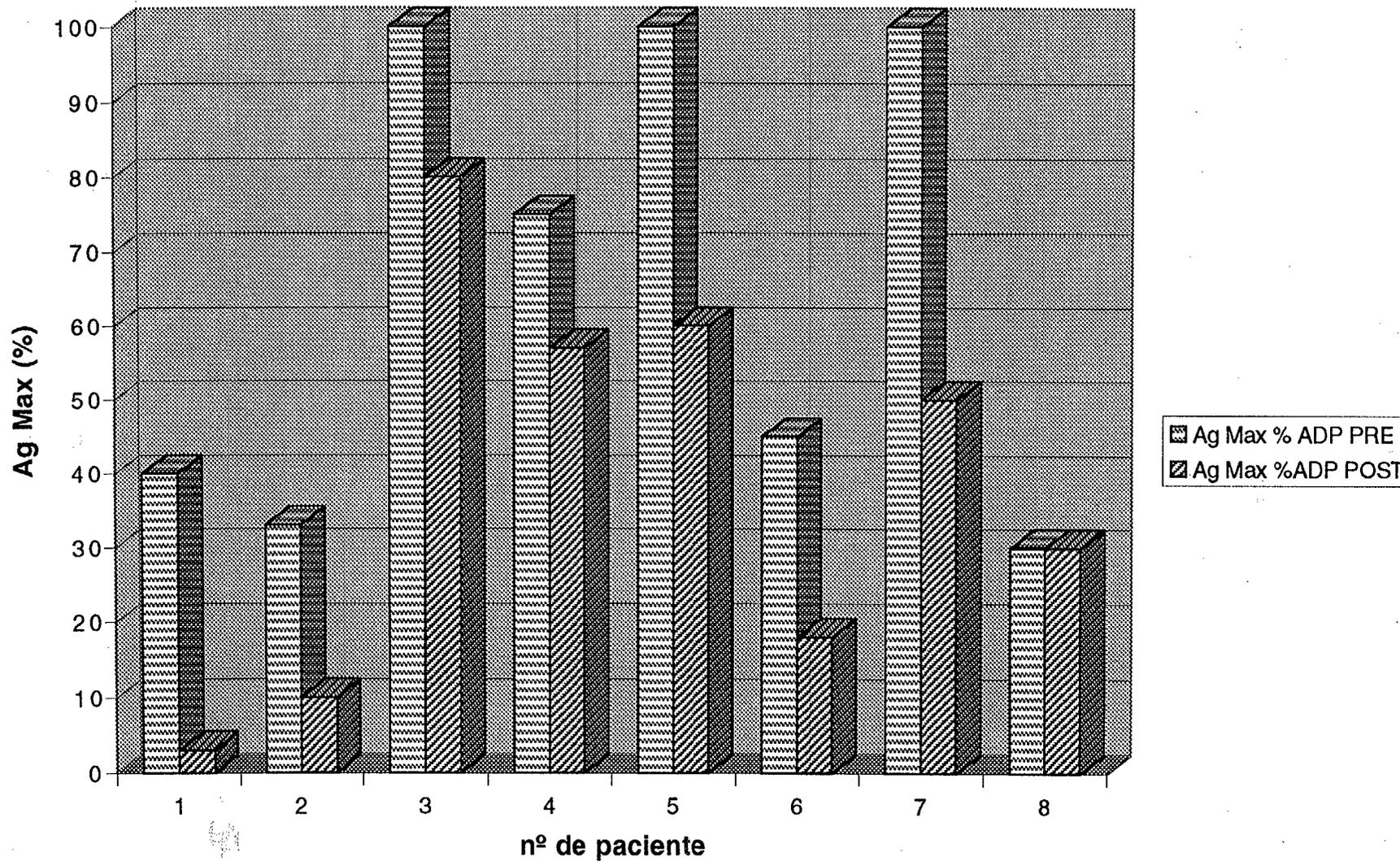
Gráfica 9:1/2 Tiempo hasta Ag Max en respuesta a AA



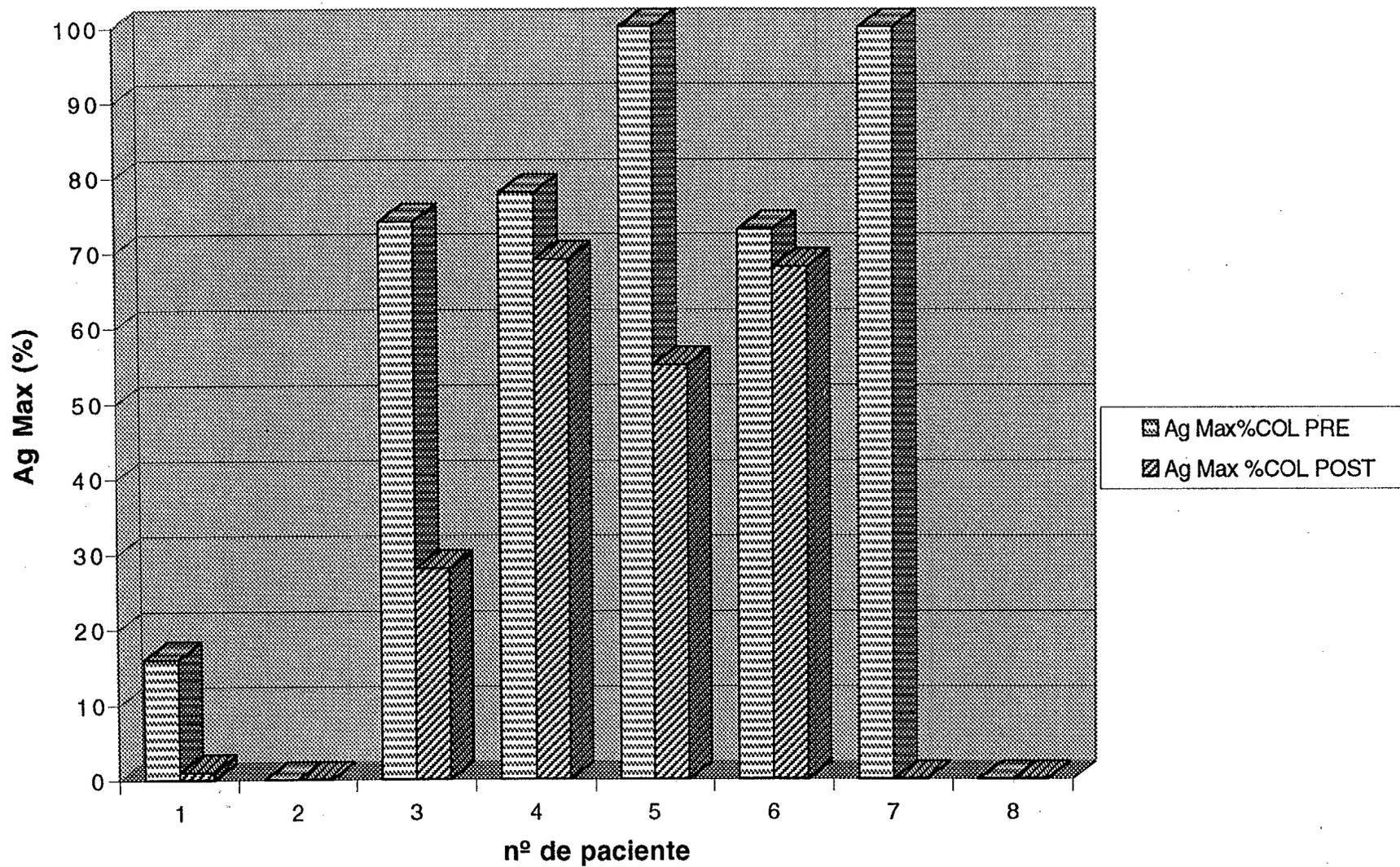
### Gráfica 10: Recuentos plaquetarios



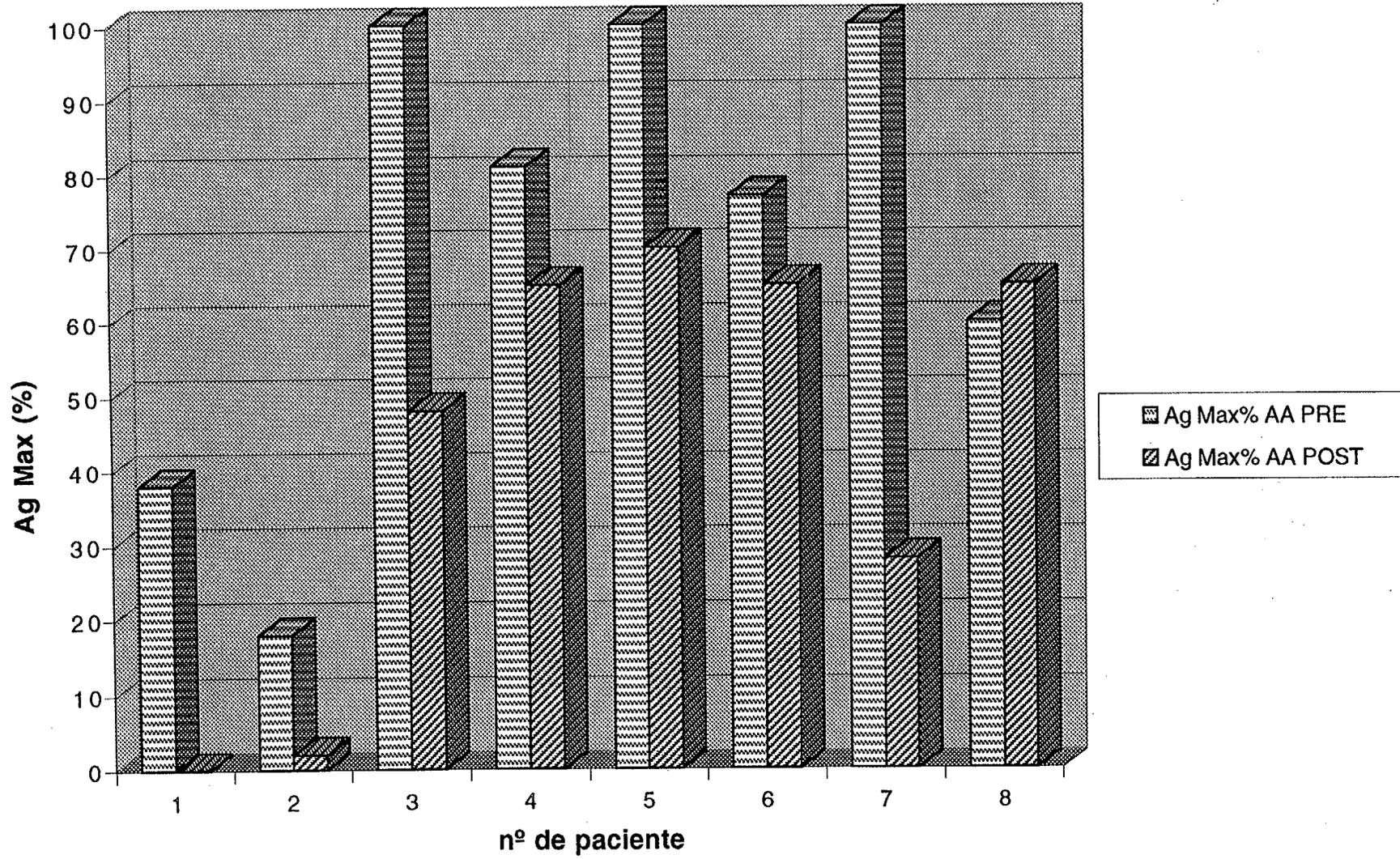
Gráfica 11: Agregación máxima en respuesta a ADP



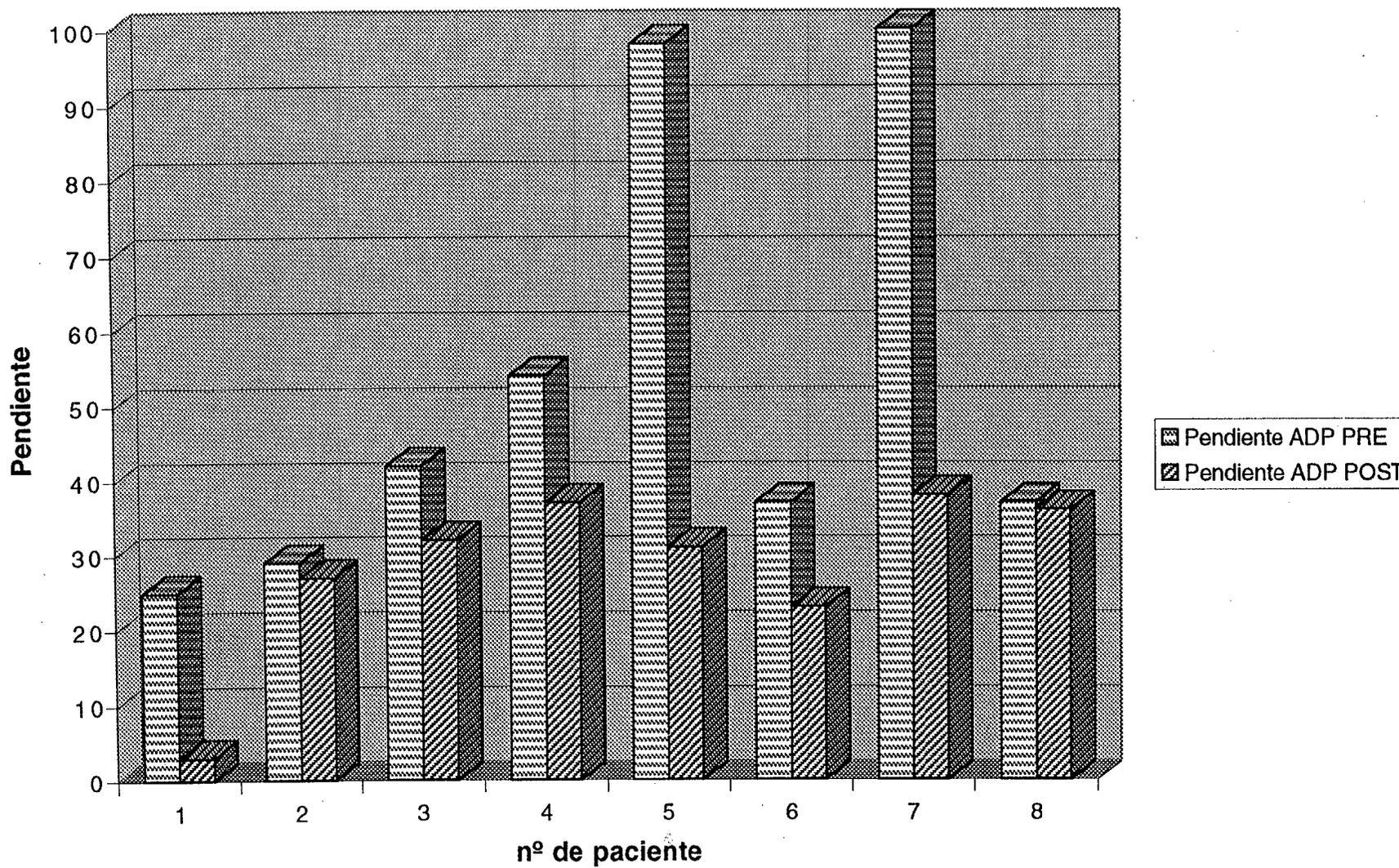
Gráfica 12: Agregación máxima en respuesta al COL



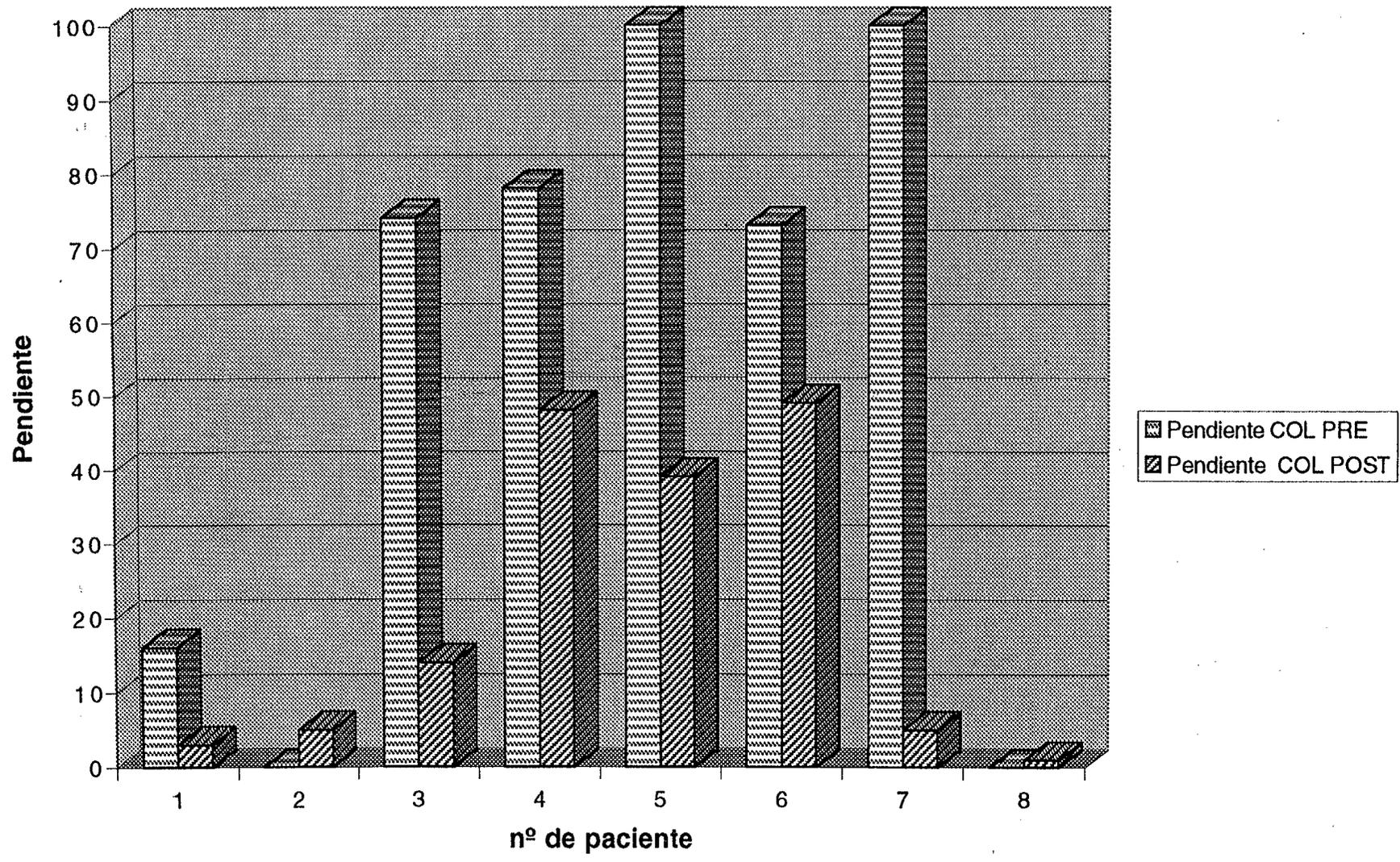
Gráfica 13: Agregación máxima en respuesta al AA



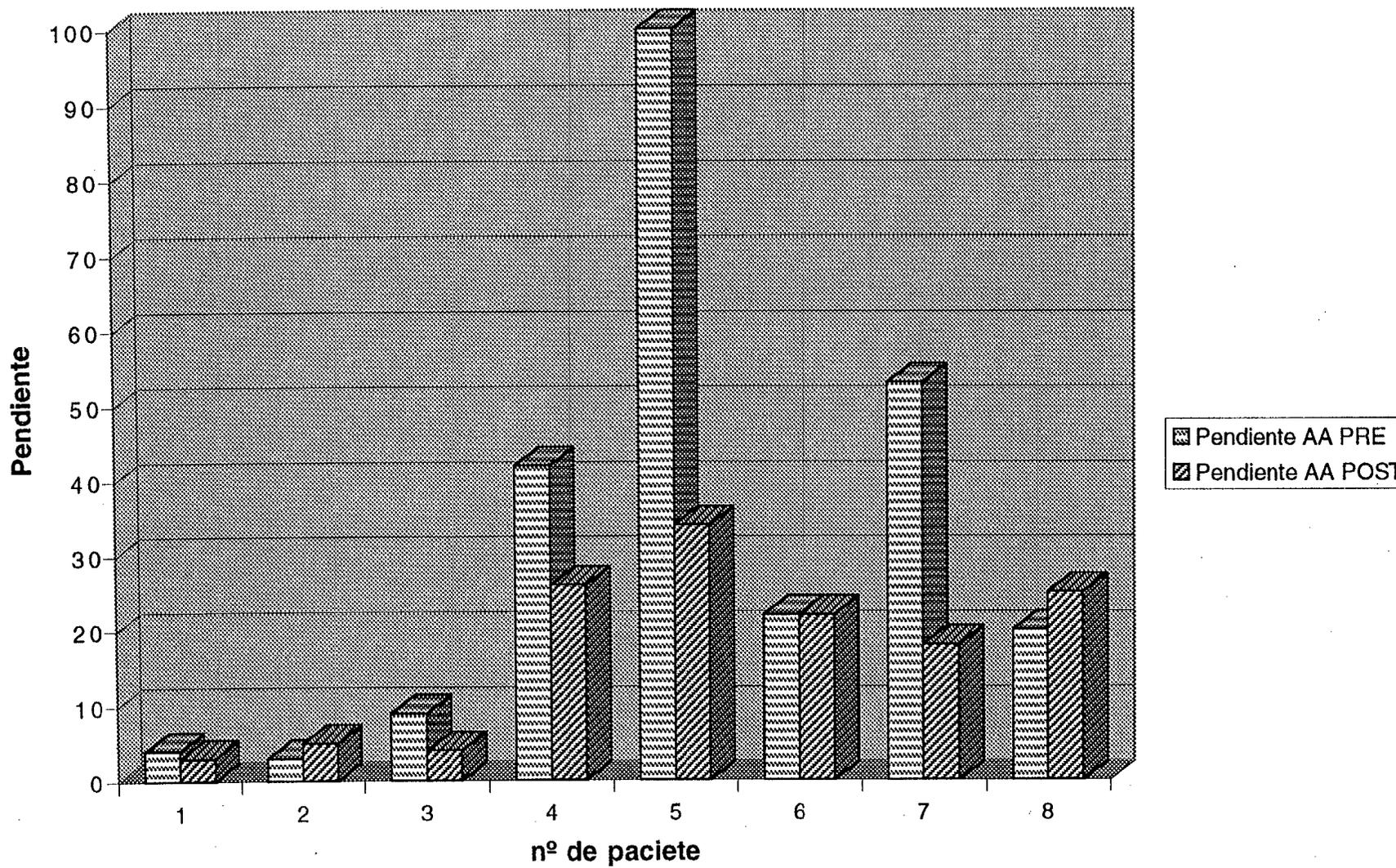
Gráfica14: Pendiente en respuesta al ADP



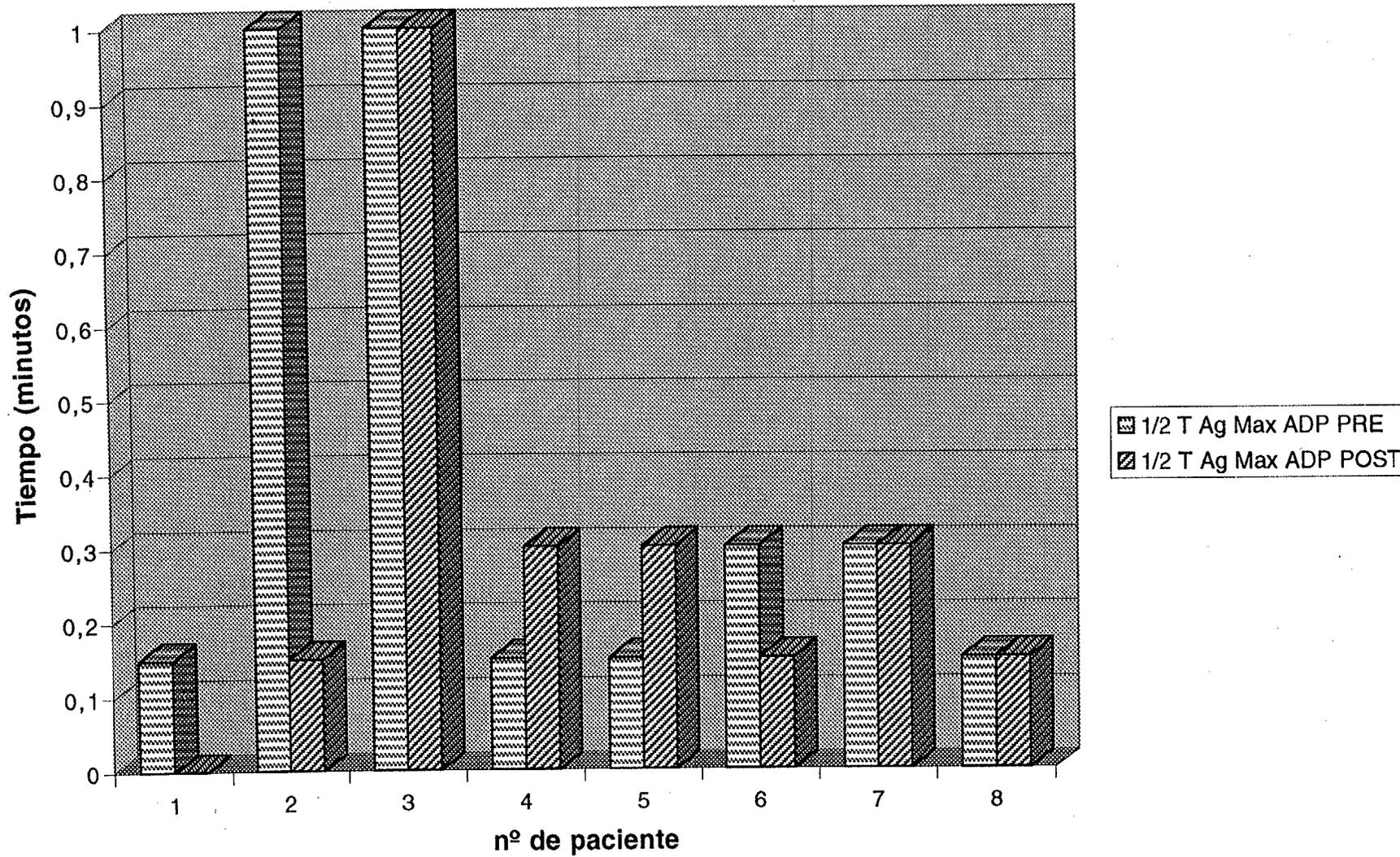
Gráfica 15: Pendiente en respuesta al COL



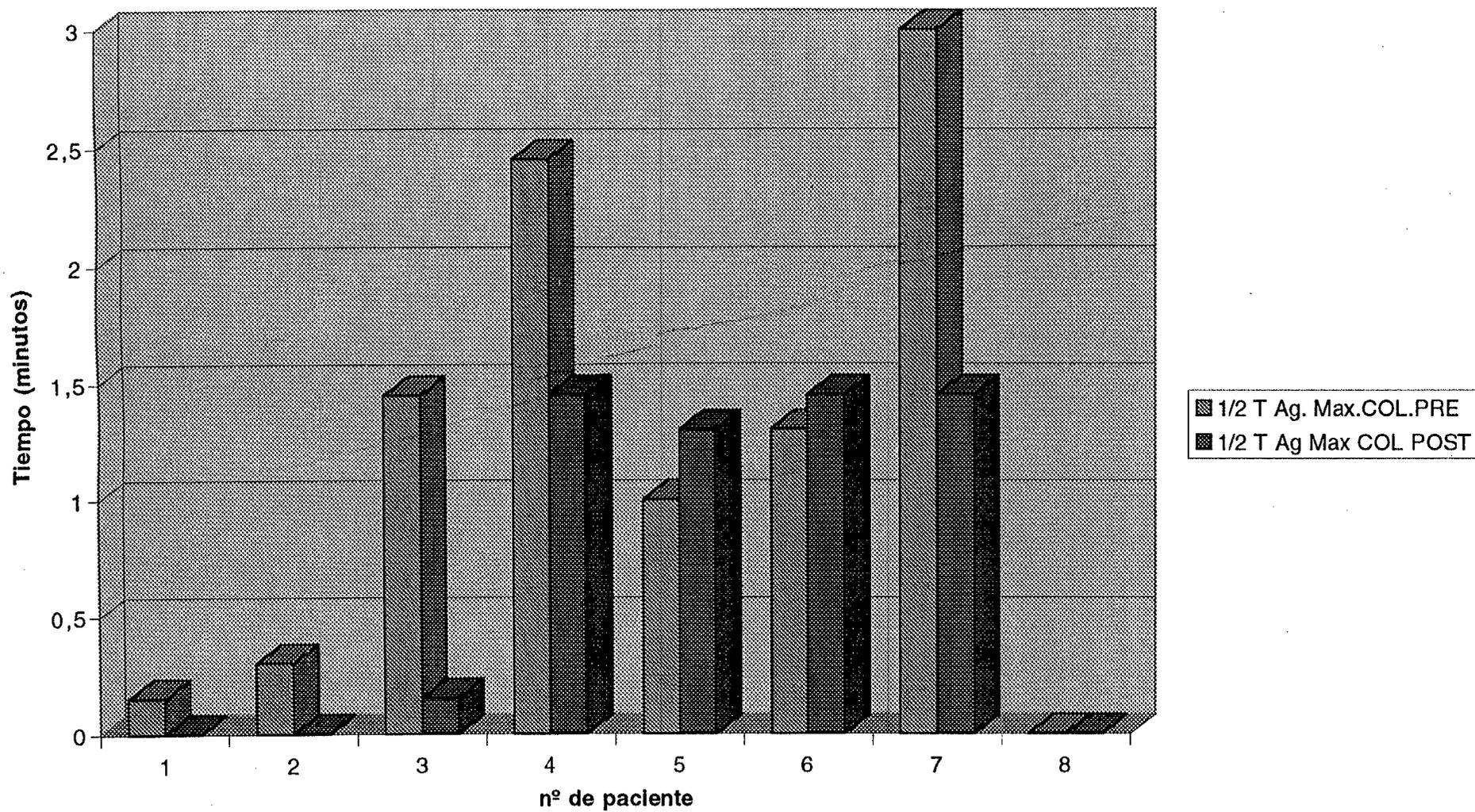
Gráfica 16: Pendiente en respuesta al AA



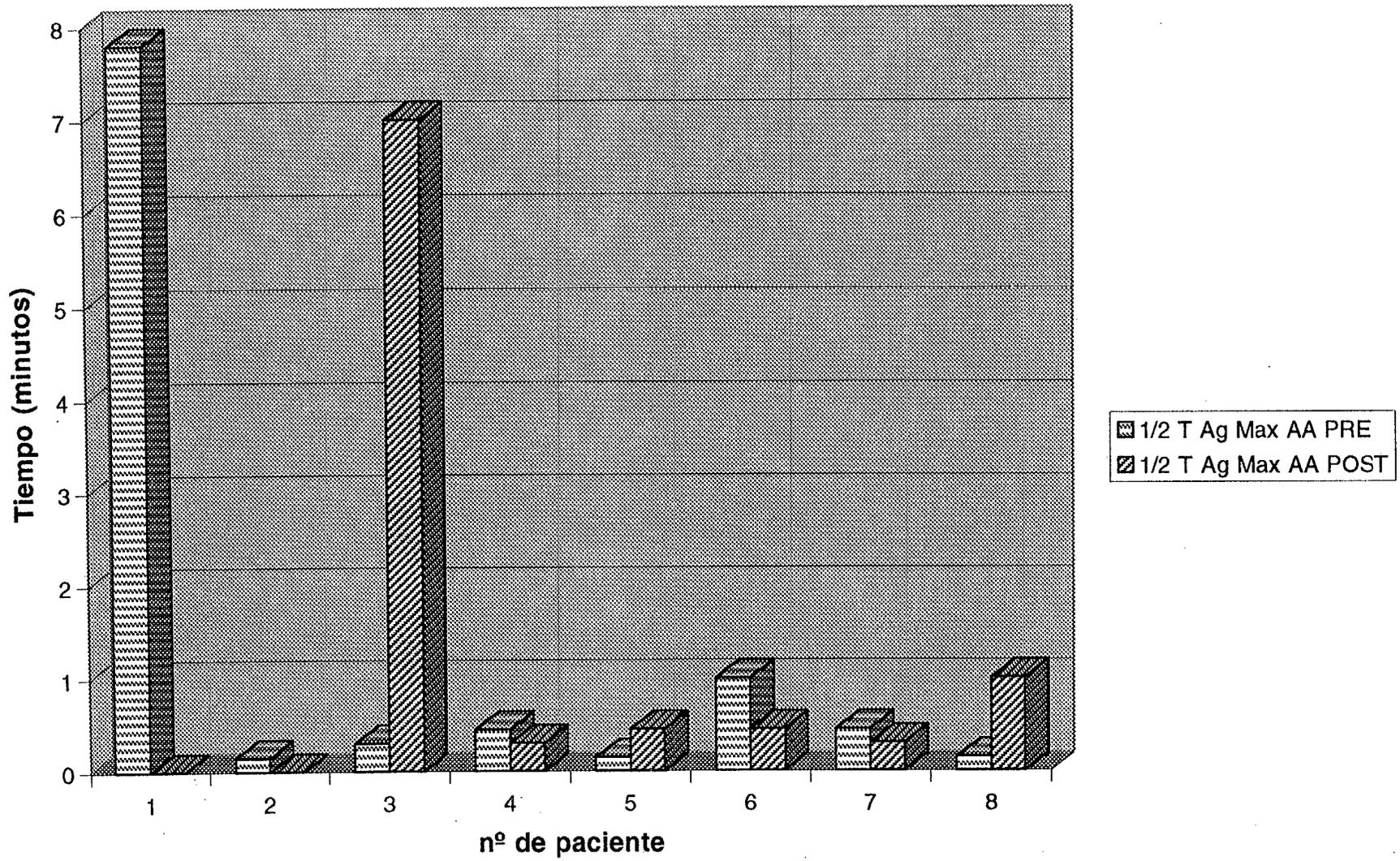
Gráfica 17: 1/2 Tiempo hasta Ag Max en respuesta a ADP



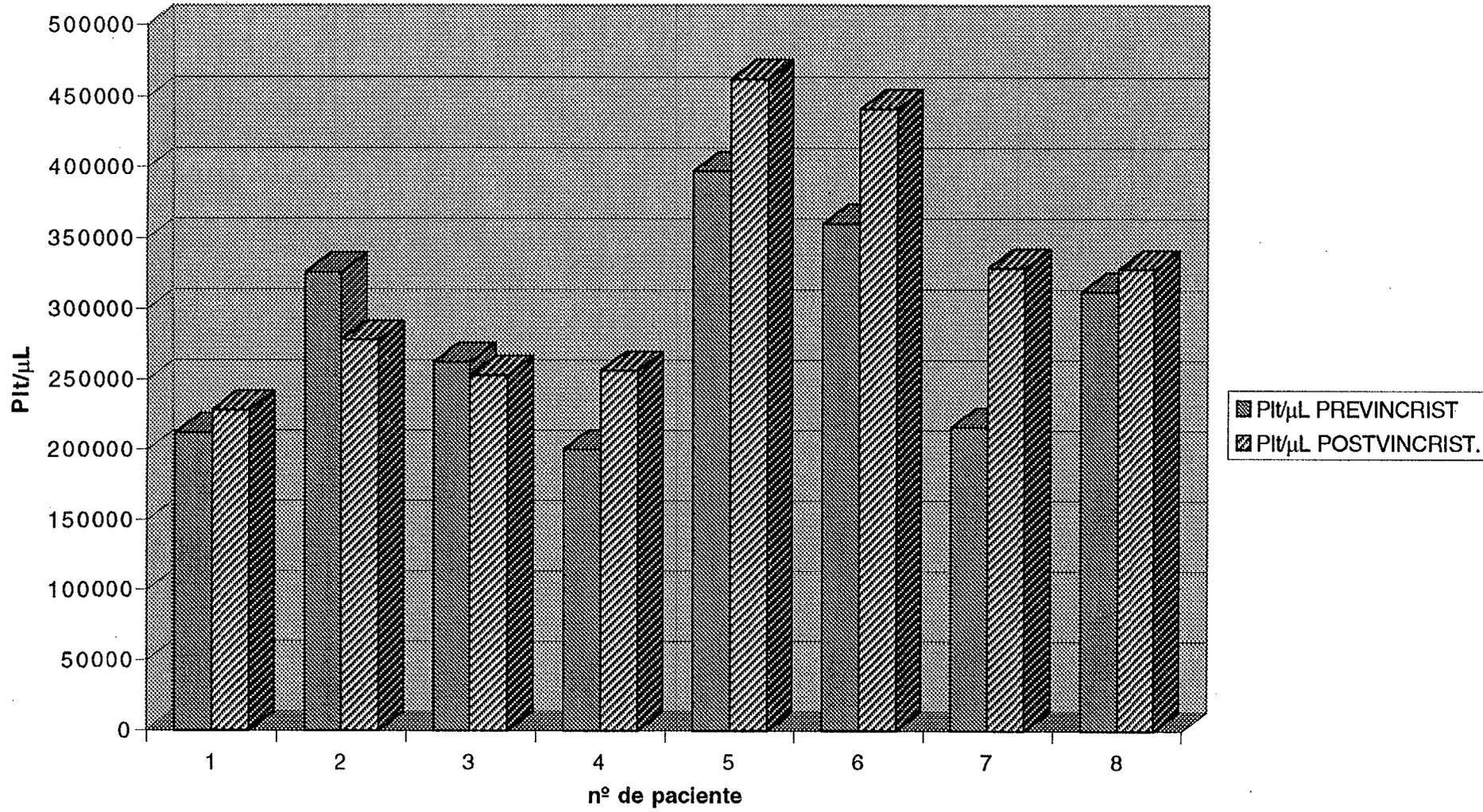
Gráfica 18: 1/2 Tiempo hasta Ag Max en respuesta al COL



Gráfica 19: 1/2 Tiempo hasta Ag Max en respuesta al AA



Gráfica 20: Recuentos plaquetarios



## 5.- DISCUSIÓN

### 5. 1.- IDONEIDAD DEL MÉTODO.

La agregometría plaquetaria por turbidimetría en PRP ha sido utilizada rutinariamente como método de evaluación de la funcionalidad de estas células sanguíneas (Mackin, 1995) tanto en investigación oncológica y hematológica como en la práctica clínica (Remaley et al, 1989; George y Shattil, 1991; Relford, 1992). Hemos preferido este método de evaluación por evitar las influencias de otros elementos formes, pues si bien la manipulación necesaria para la obtención de PRP podría influir de algún modo en los resultados, no es menos cierta la ejercida por los neutrófilos, los hematíes y la concentración de estos (Clemmons et al., 1983; Ingemar-Wojensky, 1984; Abbate et al., 1986; Nguyen et al, 1995). Además, el empleo de tiempos de centrifugación mas cortos y mayor velocidad, minimiza la obtención de poblaciones de plaquetas no representativas, obteniéndose valores mas elevados de volúmenes plaquetarios medios (Clemmons et al, 1983).

La inhibición de la agregación plaquetaria frente al ADP y epinefrina por la adición de eritrocitos ha sido puesta de manifiesto experimentalmente grupo de investigadores, si bien la inducida por el COL no pareció verse afectada. Los hematíes pueden interferir con la agregación plaquetaria por diversos mecanismos. En primer lugar, estas células sanguíneas pueden liberar ADP, que puede estimular la agregación plaquetaria de un modo directo, como se describió en la revisión bibliográfica y por otra parte pueden competir con la epinefrina, otro agonista capaz de inducir agregación "in vitro". Además, se ha considerado la posibilidad de interferencia mecánica con la colisión plaqueta-plaqueta (Balduini et al., 1988).

## 5.2.- AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON PROCESOS INFLAMATORIOS CRÓNICOS.

Desconocemos la existencia de estudios en este sentido, si bien como manifestamos en la sección de revisión bibliográfica, diversos cuadros específicos humanos han sido estudiados por citometría de flujo y marcadores inmunológicos, pudiendo incluso cursar con hiperagregabilidad debida a la presencia de mediadores de la inflamación. Procesos como la enfermedad de Crohn pueden tener como etiopatogenia infartos microvasculares multifocales debidos la mencionada hiperagregabilidad, puesta de manifiesto por turbidimetría "in vitro" y por citometría de flujo (Collins et al., 1994; Collins y Rampton, 1997).

Al analizar estadísticamente nuestros resultados solo hemos encontrado significación estadística ( $P=0'029$ ). al evaluar la pendiente para el AA (Tabla 7 y Gráfica 6). Hemos de tener en cuenta que la potencia (o posibilidad de detectar diferencias significativas, expresada en tantos por ciento) de todas las pruebas estuvo por debajo del valor deseado de (0'800), por lo que los resultados negativos deben estudiarse con precaución. Uno de los principales motivos a los que puede deberse este valor de la potencia es el bajo número de pacientes incluidos en el grupo. Al ser el Hospital Veterinario Docente de la Universidad del Estado de Ohio un centro de referencia, fue extremadamente difícil conseguir animales que cumplieran los requisitos de inclusión establecidos para el estudio.

En todo caso, un 50% de los pacientes del grupo 2 respondieron con la intensidad máxima al ADP, y en general mostraron mayor capacidad para reaccionar frente a este agonista que los animales incluidos en los dos grupos restantes. Además, esta reacción se llevó a cabo en general en un tiempo más corto, y con un mayor ritmo de agregación. Respecto al colágeno, el Grupo 2 presentó el mayor porcentaje de muestras que agregaron frente a este agonista, y la respuesta al AA, en general débil, fue superior al 60 % en la mitad de las muestras procedentes del Grupo 2. Si bien no podemos afirmarlo debido al escaso número de muestras, los pacientes con

## Discusión.

inflamaciones crónicas diversas parecen poseer plaquetas hiperagregables en relación al comportamiento observado en las procedentes de perros normales. Este hecho corroboraría lo manifestado en estudios de procesos inflamatorios más específicos. La participación activa de los trombocitos como células inflamatorias puede tener lugar de forma habitual en cualquier situación de esta índole, y presentar una mayor reactividad en todas sus funciones, como respuesta a mediadores inflamatorios liberados por ellas mismas o cualquier otro tipo celular implicado (Nash, 1994; Mannaioni, 1997). Por tanto, los estados anormales de coagulación detectados en procesos neoplásicos, podrían, al menos en parte, deberse a la concurrencia de inflamación. La razón por la cual no se manifiestan estados hiperagregables en muchas ocasiones podría ser la utilización de antiinflamatorios, esteroides o no, que atenuarían o anularían la capacidad de respuesta por parte de los trombocitos (Schaffer, 1995). La clarificación del proceso por el cual se produce esta hiperagregabilidad, en la cual podrían intervenir otras células inflamatorias, justificaría el desarrollo de investigaciones posteriores, aumentando el número de casos a estudiar, y complementando el estudio con otros métodos como la citometría de flujo y la detección de marcadores de actividad plaquetaria. Además, la agregometría en sangre completa podría aportar interesante información, pues debemos considerar los efectos que sobre la agregación plaquetaria puedan tener los leucocitos (Zhou et al., 1992).

### 5. 3.- AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON NEOPLASIAS MALIGNAS.

Al estudiar los resultados obtenidos en el grupo 3 y compararlos con los correspondientes al grupo control, no hemos obtenido diferencias con significación estadística en ninguno de ellos. En general, los valores medios obtenidos tienden a ser menores en el grupo 3 que en el grupo 1, lo cual supondría una menor agregabilidad, o bien que las plaquetas de estos pacientes hayan sido activadas previamente y se hubiesen producido microagregaciones en alguna etapa del procedimiento anterior a la agregometría, si bien no se observaron agregaciones espontáneas en la fase previa a la adición de agonistas ni microagregados durante el recuento celular. Estos resultados contrastan con los de diversas investigaciones llevadas a cabo en pacientes humanos y caninos con cáncer (Gassic et al, 1976; Honn, 1988, 1992: ), entre ellas con el trabajo recientemente publicado por McNeil y colaboradores (1997), en donde el grupo de pacientes con cáncer por ellos estudiado mostró una mayor y más rápida agregabilidad plaquetaria en respuesta al COL, pero sin embargo, la reacción al ADP fue en general menor en ambos grupos que la observada por nosotros.

Esta aparente diferencia puede ser debida a varios factores. En primer lugar, al hecho de que el citado grupo investigador trabajó con sangre completa y no con PRP, y la presencia de los restantes elementos formes ejerce una clara influencia sobre la medición (Ingemar-Wojensky, 1984). Además, se ha puesto de manifiesto una mayor agregabilidad plaquetaria para el COL cuando se utiliza SC en lugar de PRP, en muestras procedentes de una misma extracción (Abbate et al., 1986).

En ambos estudios los pacientes incluidos en el grupo de enfermos presentaban muy diversos tipos de neoplasias y en ninguno de los dos se ha empleado criterio de clasificación o subagrupamiento en base a las características histopatológicas del tumor o el grado de afección clínica del paciente. La capacidad agregante plaquetaria y la actividad trombógena varían notablemente de unos tumores a otros, según se ha demostrado

## Discusión.

experimentalmente con diversas estirpes celulares tumorales humanas y murinas (Gassic et al., 1976; Tanaka et al., 1986). Si además tenemos en cuenta que aun no se han dilucidado completamente los mecanismos de influencia de las neoplasias malignas sobre los de coagulación y metástasis, no sería extraña la existencia de un comportamiento diferente entre dos grupos heterogéneos de perros portadores de tumores malignos. Ambas investigaciones se realizaron con pacientes afectados de tumores espontáneos, y por lo tanto no es fácil subdividirlos desde el punto de vista práctico, ya que tendrían que considerarse, además del tipo histológico, factores tan diversos como el grado de invasión local, la existencia o no de metástasis, el grado histológico, la concurrencia de complicaciones inflamatorias y/o infecciosas del propio tumor, o la concurrencia de otros procesos morbosos no relacionados con este. Incluso se ha evidenciado la influencia de distintas concentraciones de hematíes en muestras de SC (Clemmons et al., 1983), por lo que los valores de hematocrito, frecuentemente anormales en pacientes cancerosos (Couto, 1986), podrían constituir un factor de variación. El diseño de un sistema de valoración de estas y otras posibles variables sería un paso previo extremadamente útil a la hora de analizar la valiosa información que los tumores espontáneos pueden aportar. Además, la investigación en este sentido se enriquecería enormemente con la cooperación de varios hospitales universitarios que coordinasen sus investigaciones de modo que sus datos fueran comparables.

#### 5. 4.- COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS 2 Y 3.

Solo se obtuvo significación estadística para la pendiente tras la adición de ADP, en donde el valor de esta variable en el grupo 3 fue significativamente menor que la misma en el grupo 2. En la totalidad de variables restantes, medianas y percentiles o medias, desviaciones estándar e intervalos de confianza arrojaron valores también más bajos para el grupo 3 que para el grupo 2, y aunque no se obtuvo significación estadística, en algunos casos el valor de P fue próximo al deseado de 0'05. La ausencia de significación estaría notablemente afectada por el escaso número de perros que integran este grupo, haciendo pensar que si las circunstancias que limitaron el tamaño de la muestra se pudiesen subsanar en experiencias posteriores, los perros con cuadros inflamatorios crónicos podrían tener plaquetas hiperagregables. La existencia de estados hiperagregables o protrombóticos ha sido descrita en varias enfermedades inflamatorias crónicas mediante la detección de marcadores inmunológicos de activación, y cambios morfológicos en las plaquetas activadas, detectables por citometría de flujo (Collins et al, 1994; Klinger, 1997; Mannaioni et al, 1997).

## 5. 5.- EFECTOS DE LA VCR SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON CÁNCER.

En nuestro estudio hemos observado una disminución de la agregación primaria, representada por la pendiente como en la secundaria, expresada como agregación máxima (Ag Max %), y un aumento en el tiempo de agregación de las plaquetas tras la administración de VCR. La citada disminución en la agregación primaria tuvo significación estadística en las curvas obtenidas tras la adición de ADP y COL (Tabla 9 y Gráficas 14 y 15), pero no en las correspondientes al AA (Tabla 9 y Gráfica 16). Tras la adición de este último agonista se produjo una reducción en la pendiente de cinco de los pacientes evaluados, de forma menos notable que en los casos anteriores, pero los tres restantes experimentaron un discreto aumento. Las agregaciones secundarias fueron claramente más débiles en las muestras Post-VCR que en las Pre-VCR. En las correspondientes a ADP y AA, esta reducción fue estadísticamente significativa, y aunque no lo fue para COL, el valor de P era de 0'06, solo muy ligeramente más alto que el deseado de 0'05, y con un valor de la potencia de 0'568 que, como se ha comentado en varias ocasiones, induce a admitir la significación estadística también para este caso.

Nuestros resultados están en la línea de las observaciones realizadas por Matera et al. (1994) mediante la adición "in vitro" de VCR a PRP de humanos sanos, siendo también la turbidimetría el método de evaluación. Sin embargo, contrastan con los obtenidos por Mackin y cols. (1995) tras la administración de VCR a perros sanos. Si bien el sistema de agregometría utilizado por estos últimos autores es el mismo que el nuestro, diversos factores fueron diferentes entre los dos estudios. En la experiencia de Mackin se emplearon solo dos de los agonistas usados por nosotros (ADP y COL) pero a concentraciones diferentes y un tercero distinto y por tanto no comparable.

Sin embargo, creemos que la diferencia puede deberse a otro factor: el tiempo transcurrido desde la administración de la VCR y la obtención de las muestras, ya que Mackin y su grupo realizan las extracciones entre 24 horas y

## Discusión.

diez días después de haber administrado el fármaco. Por ejemplo, este retraso en la extracción podría permitir la liberación de nuevas plaquetas, más activas. Los cambios inducidos por la VCR en las plaquetas ocurren de forma rápida (Stenberg et al, 1994), y además esta droga estimula la liberación de las citadas células por parte de los MC. Por tanto, al efectuarse la medición a partir de las 24 horas de la administración del fármaco, daría tiempo a que las plaquetas afectadas por este fuesen fagocitadas por macrófagos, o bien enmascaradas o sustituidas por otras más recientemente liberadas, quizá poseedoras de una mayor capacidad funcional, como mecanismo compensatorio a la permanencia en el torrente circulatorio de una cierta cantidad de trombocitos hipo o afuncionales. Este fenómeno pasaría inadvertido en pacientes no trombocitopénicos, ya que como se vio en la revisión bibliográfica no es probable que produzca hemorragias, pero no debe subestimarse en pacientes con TIM. En estos pacientes podría, en ciertas ocasiones, darse la situación de que las plaquetas circulantes con actividad disminuida por la VCR, que además están siendo fagocitadas por los macrófagos, resulten insuficientes para desarrollar una adecuada actividad hemostática y hasta tanto no sean sustituidas, permitir un aumento en la intensidad de hemorragias existentes, o la aparición de las mismas.

La irreversibilidad de la disfunción plaquetaria inducida por la VCR ha sido bien documentada de forma experimental, así como la correlación de ésta con la aparición de cambios morfológicos en estas células (Stenberg et al, 1995). Por tanto, no es muy probable que las plaquetas afectadas puedan recuperar su funcionalidad en perros con TIM.

Los resultados obtenidos en este estudio, podrían servir de apoyo y explicación a la mencionada observación clínica de hemorragias transitorias tras la administración del citado alcaloide a perros con TIM (Couto, 1986).

Otro aspecto de gran importancia en relación a los resultados obtenidos es la influencia que la droga pueda tener en la interacción entre plaquetas, células tumorales y endotelio vascular. La administración de

## Discusión.

fármacos antitrombóticos, como la prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) o sus derivados o análogos más estables, reduce espectacularmente la incidencia de metástasis en modelos experimentales (Honn et al, 1981, 1986, 1992; Schneider et al, 1994). Sin embargo, y salvo contadas excepciones, los resultados obtenidos en pacientes humanos y caninos con sustancias antitrombóticas son mucho menos espectaculares (Hamilton et al, 1987; Tzanakakis et al, 1993).

Considerando su vía de administración, ritmo de metabolización y posibles efectos adversos, la VCR no es una droga práctica para usar a largo plazo como inhibidora de metástasis. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la administración a corto plazo de este fármaco puede prevenir el desarrollo de metástasis, además de su efecto citotóxico.

En resumen conviene señalar que los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren la existencia de un incremento en la agregabilidad plaquetaria en perros con procesos inflamatorios crónicos, en relación a la observada en perros sanos y con procesos neoplásicos malignos, aunque dicho incremento no alcance, para todos los parámetros considerados en ambas comparaciones, una significación estadística por las razones expuestas a lo largo de este capítulo. No obstante conviene destacar en este sentido las diferencias estadísticamente significativas que se presentan entre perros afectados por cuadros inflamatorios crónicos y perros con neoplasias malignas; el ritmo de agregación plaquetaria medido en PRP por el método turbidimétrico tras la adición de AA es mayor en el caso de los primeros.

También conviene señalar que en nuestro estudio no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la agregación plaquetaria, determinada por turbidimetría en PRP, entre perros con cáncer y sanos.

Por otra parte quedan suficientemente probados los efectos de la administración de vincristina a perros con cáncer sobre la agregación plaquetaria cuando esta es determinada en PRP por el método turbidimétrico. Dichos efectos consisten en la inhibición de la agregación plaquetaria primaria y secundaria, detectada una hora después de administrar el citado fármaco. Estos efectos deben tenerse en cuenta a la hora

## Discusión.

de emplear este alcaloide en perros con TIM ya que la disminución de la actividad plaquetaria en perros trombocitopénicos puede dar lugar a hemorragias espontáneas.

## 6.- CONCLUSIONES

## Conclusiones

1ª.- La agregación plaquetaria, medida por turbidimetría en plasma rico en plaquetas, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre perros con procesos inflamatorios crónicos y perros sanos.

2ª.- La agregación plaquetaria, medida por turbidimetría en plasma rico en plaquetas, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre perros con neoplasias malignas y perros sanos.

3.- La agregación plaquetaria, determinada en plasma rico en plaquetas por el método turbidimétrico frente al ADP presentó un ritmo de agregación mayor en el grupo de perros afectados de cuadros inflamatorios crónicos que en los afectados de neoplasias malignas.

4ª.- La administración de vincristina a perros con cáncer determina una inhibición de la agregación plaquetaria primaria y secundaria una hora después de la citada administración..

## 7.- RESUMEN.

## Resumen.

Las alteraciones hematológicas asociadas a neoplasias malignas del hombre y los animales domésticos son relativamente comunes, ya sea como frecuente complicación del proceso maligno, o como hallazgo laboratorial de desconocida significación clínica, destacando entre ellas las relacionadas con función plaquetaria. Además, estas células sanguíneas desempeñan un labor de importancia creciente en la enfermedad metastásica. El estudio de la agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas por turbidimetría es un método válido y ampliamente utilizado para evaluar la funcionalidad de los trombocitos en distintas situaciones morbosas. Se ha postulado la posibilidad de que la cronicidad frecuente en la mayoría de los procesos neoplásicos pueda ser en parte, responsable de las alteraciones funcionales a menudo observadas. En el presente estudio, hemos evaluado la agregación plaquetaria frente al ADP, COL y AA en veintiún perros de varias razas y edades, con neoplasias malignas, comparándola con la de seis perros con procesos inflamatorios crónicos y dieciséis animales sanos, que actuaron como grupo control. La intensidad de reacción, medida por la pendiente de la curva de agregación, al emplear AA como agonista, fue significativamente mayor ( $P=0'029$ ) para el grupo de perros con inflamaciones crónicas al compararlo con los afectados de cáncer. Si bien no se obtuvieron valores significativos desde el punto de vista estadístico para las restantes variables, en la mayoría de los casos, los valores procedentes del grupo de perros con cuadros inflamatorios crónicos fueron más altos que los de aquellos afectados de cáncer, mostrando los animales sanos unos valores a menudo intermedios entre los grupos antes mencionados.

Paralelamente, se evaluó la función plaquetaria antes y una hora después de la administración de 0'5 mg/kg. de vincristina en ocho perros con tumores espontáneos en fase de remisión, mediante el mismo método. Las respuestas al ADP y COL fueron significativamente más bajas tras la administración de VCR ( $P=0'032$  y  $P=0'013$ , respectivamente). La agregación máxima tras la administración de VCR también se redujo de forma significativa frente a ADP y AA ( $P=0'002$  y  $P=0'013$  respectivamente).

## 8.- SUMMARY

## Summary.

Hematologic abnormalities are a common finding in man and domestic animals affected with cancer, either as a frequent complication of the malignancy, or as laboratory finding with or without clinical significance. Among them, special interest is focused on those related with hyper or hypofunctional platelets, of growing interest since it plays an extremely important role in the process of metastases. Turbidimetric evaluation of platelet-rich plasma samples is a validated method for assessing platelet function in man and animals with different diseases, and the effects of different drugs. Platelet hyperfunction has been found in man and animals with malignancies, and the possible role of chronicity has been considered.

We have evaluated platelet function in response to ADP, COL, and AA in 21 dogs with malignancies of different histological classification in comparison with 6 others with chronicities and a third group of 19 healthy dogs serving as control. The slope of the aggregation curve in response to ADP was significantly higher in dogs with chronic diseases than in any of the other groups. No statistical significance was obtained for the rest of the variables studied, but in general, values obtained from the dogs with chronicities were higher than those with malignancies. Values obtained from platelets of healthy dogs were usually between the other two groups.

Vincristine is a plant alkaloid widely used both as a chemotherapeutic drug in various types of cancer, and as protrombocytic in dogs affected of immune thrombocytopenia. Platelet aggregation was also evaluated before and after administration of  $0.5 \text{ mg/m}^2$  of vincristine in 8 tumor-bearing dogs (7 with lymphoma and 1 with hemangiosarcoma). Aggregation was performed with the same procedure as previous groups, and using the same agonists. The slopes for aggregation in response to ADP and COL were significantly lower after administration of vincristine ( $P=0.032$  and  $P=0.026$  respectively). Maximal aggregation was significantly lower in response to ADP and AA ( $P=0.002$  and  $0.013$  respectively).

## 9.- AGRADECIMIENTOS

## Agradecimientos.

A Guillermo Couto, por su constante guía a todo lo largo del trabajo, por enseñarme el buen camino de la investigación clínica, seria, útil y con corazón. Por todos esos buenos ratos, y sobre todo por ser mi amigo.

A Gary Kociba, por su inestimable participación en el diseño, desarrollo e interpretación día a día del presente trabajo.

A Patty Mueller, sin cuya colaboración no hubiese podido obtener la mayoría de las muestras de este trabajo, pero sobre todo hubiese sido mucho menos divertido.

A la Dra. Joan Hardy, por la realización del estudio estadístico.

A todos los clínicos, técnicos, postgraduados y estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad del Estado de Ohio, por el apoyo y las facilidades que en todo momento me dieron, especialmente al servicio de consultas externas.

A la Dra Heidi Ward, de Med Vet Ohio por aportar casos a este estudio.

Al Profesor D. Alberto Montoya Alonso, por su apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Profesor D. Francisco Rubio Royo, Rector de la Universidad de Las Palmas de G. C., por su constante apoyo.

Al Profesor D. Antonio Fernández Rodríguez, Decano de la Facultad de Veterinaria de la ULPG, amigo verdadero y motor de esta Tesis, cuya ayuda y estímulo fueron una constante en todo este trabajo, sin los que no hubiese llegado a finalizarse, o mas probablemente no se hubiese empezado.

Al profesor D. Andrés García Román, de quien no he dejado de ser alumno al convertirme en amigo, que todos los días demuestra que en la Universidad se puede tener corazón y una vez mas me lo ha dado.

A D. Carmelo Santana Rodríguez, por sus excelentes dibujos.

Al Dr. D. Pedro Saavedra, por sus consejos en el estudio estadístico.

Al Dr. D. Juan Manuel Díaz Cremades, por su colaboración en la adaptación del texto.

A la Fundación Universitaria de Las Palmas y a Unelco, impulsores de este y otros muchos proyectos de nuestra comunidad científica.

## Agradecimientos.

A la Dirección General de Universidades de la Consejería de Educación del Gobierno de Canarias, por el apoyo prestado.

A mis compañeros del área de Cirugía, Radiología y Anestesiología de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC, por su ayuda durante mi estancia en el extranjero.

A todos mis amigos, a los que no les he dado todo lo debido por este trabajo.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

## Bibliografía.

Abbate R, Favilla S, Boddi M, Costanzo G, Prisco D. Factors influencing platelet aggregation in whole blood. *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 91-96.

Ahn YS, Harrington WJ, Seelman RS, Eytel, CS. Vincristine therapy of idiopathic and secondary thrombocytopenias. *New Engl J Med.* 1974; 291: 375-380.

Ambrus JL, Ambrus CM, Mink IB, Pickern JW. Causes of death in cancer patients. *J Med.* 1975; 6: 61-64.

Balduini CL, Bertolino G, Noris P, Ascari E. The effect of red blood cells in platelet aggregation: a study with the electronic whole blood aggregometer. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 337-340.

Balduini CL, Grignani G, Sinigaglia F. Severe platelet dysfunction in a patient with autoantibodies against membrane glycoproteins IIb- IIIa. *Hemostasis*, 1978; 7: 98-104.

Bee D, Leach E, Martin, JF, Sugget AJ. The effect of vincristine on platelet aggregation studied by a filter loop technique in the rat. *Br. J. Pharmac*, 1980; 69: 227-231.

Bennet J S. Mechanisms in platelet adhesion and aggregation: an update. *Hosp Pract*, 1992; 15:124-140.

Blockmans D, Deckmyn H, Vermylen J. Platelet activation. *Blood Rev* 1995; 9: 143-156.

Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 1962; 194: 927-929.

Bowers, TL. The role of platelets in pulmonary disease. *Comp Cont Ed*, 1989; 11: 1989.

Chau LY, Jii YJ. Characterization of <sup>3</sup>H labelled platelet activating factor receptor complex solubilized from rabbit platelet membranes. *Biochem Biophys Acta* 1988; 970: 103-112.

## Bibliografía.

Choi, S; The mechanisms of vincristine-induced thrombocytopenia. *Blood* 1972; 40: 965.

Clemmons RM, Bliss EL, Dorsey-Lee MR, Seachord CL, Meyers KM. Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food producing animals. *Thromb Haemostas* 1983; 50: 838-843.

Clemmons RM, Meyer KM. Acquisition and aggregation of canine blood platelets: Basic mechanisms of function and differences because of breed origin. *Am J Vet Res* 1984; 45: 137-144.

Colman RW. Platelet activation. Role of an ADP receptor. *Semin Haematol* 1986; 23: 119- 128.

Collins CE, Cahill MR, Newland AC, Rampton DS. Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1994; 106: 840-845.

Collins CE, Rampton DS. Platelets in inflammatory bowel disease. Pathogenic role and therapeutic implications. *Aliment Pharmacol Ther*, 1997; 11: 237-247.

Couto, CG. Use of vincristine in thrombocytopenic dogs. Clinical observations. Personal communication, 1986.

Couto CG. Hematologic abnormalities in small animal cancer. *Comp Cont Ed Pract Vet*. 1984; 6: 1059-1065.

Couto CG. Principles of cancer treatment. En: Nelson RW, Couto CG. *Essentials of Small Animal Internal Medicine*. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc. 1992: 838-841.

Di Minno G, Martinez J, McKean ML et al. Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. *Am J Med* 1985; 79: 552-559.

## Bibliografía.

Dorn GW 2nd, De Jesus A. Human platelet aggregation and shape change are coupled to separate thromboxane A<sub>2</sub>-prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. *Am J Physiol* 1991; 260: H327-H334.

Eggerman TL, Ersen NH, Robertson RP. Separate receptors of prostacyclin and prostacyclin E<sub>2</sub> on human gel-filtered platelets. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; 236: 568-573.

Fineman LS. Diagnosing and treating canine idiopathic thrombocytopenic purpura. *Veterin Med* 1996; 829-840.

Forsythe LT, Jackson ML, Meric SM. Whole blood platelet aggregation in uremic dogs. *Am J Vet Res* 1989; 50:1754-1757.

Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7450-7454.

Fujisawa K, Tani P, Piro L, McMillan R. The effect of therapy on platelet associated auto-antibody in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1993; 11: 2872-2877.

Furie B, Furie BC. P-selectin induction of tissue factor biosynthesis and expression. *Haemostasis* 1996; 26 Supl 1: 60-65.

Gassic GJ, Gassic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proceedings NAS* 1968; 61: 46-53.

Gassic GJ, Koch PAG, Hsu B. Thrombogenic activity of mouse and human tumors: Effects on platelets, coagulation, and fibrinolysis, and possible significance for metastases. *Z Krebs Forsch* 1976; 86: 263-277.

Gaunt SD, Baker DC, Babin SS. Platelet aggregation studies in dogs with acute Ehrlichia platys infection. *Am J Vet Res* 1990; 2: 290-293.

George JN, Nurden AT. Inherited disorders of the platelet membrane: Glanzmann thrombastenia, Bernard-Soulier syndrome and other disorders. In Colman RW, Hirsch J Marder UJ, Salzman EW (De). *Hemostasis and*

## Bibliografía.

thrombosis: Basic principles and clinical practice, Third ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994.

George J N, Shattil SJ. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med*, 1991; 1: 27-39.

George JN, Woolf SN, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, Blanchette VS, Bussel JB, Cines DB, Kelton JG, Lichtin AE, McMillan R, Okerbloom JA, Regan DH,Warrier Y. Idiopathic thrombocytopenic purpura: A practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood*,1996; 88: 3-40.

Gewirtz AM, Schick,B. Megakariocytopoiesis. In: Colman RW, Hirsch J, Marden VJ, Salzman EW, eds. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice, third ed., Philadelphia, PA: Lippincott Company, 1994: 353-388.

Giolino P, Ambrosio G, Ragni M, Pascucci Y, Triggiani M, Oriente A, McNatt, Buja M, Condorelli M, Chiarello M, Willerson JT. Short term and long term role of platelet-activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation. *Circulation*, 1993; 88: 1205-1214.

Gordon SG Lewis BJ. Comparison of procoagulant activity in tissue culture medium from normal and transformed fibroblasts. *Cancer Research* 1978; 38: 2467-2472.

Gordon S, Witul M, Cohen H, Sciandra J, Williams P, Gastpar H, Murphy GP, Ambrus JL. Studies on platelet aggregation inhibitors in vivo. VIII. Effect of pentoxifyline on spontaneous tumor metastasis. *J Med* 1979; 10: 435-443.

Green CE, Scoggin J, Thomas JE, Barsanti JE. Vincristine in the treatment of thrombocytopenia in five dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180:140-143.

Green RT. Canine ehrlichiosis: clinical implications for humoral factors. In: Bonagura JD, Ed. *Kirk's Current Veterinary Therapy*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1995: 290-293.

## Bibliografía.

Hamilton HB, LaRue SM, Withrow S J. Effect of RA233 on metastasis in dogs with osteosarcomas. *Am J Vet Res*, 1987; 9: 1380-1381.

Handagama P, Feldman BF. Thrombocytopenia and drugs. *Vet Clin North Am (Small An Pract)* 1988; 18: 51-65.

Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993; 7: 52-62.

Harrus S, Waner T, Eldor A, Zwag E, Bark H. Platelet dysfunction associated with experimental canine ehrlichiosis. *Vet Rec* 1996; 139: 290-293.

Hawiger J. Introduction to platelet structural and functional organization. *Methods Enzim* 1992; 215: 3-5.

Helfand SC. Platelets and neoplasia. *Vet Clin North Am (Small An Pract)* 1988; 18: 131-156.

Helfand SC, Couto CG, Madewell BR. Immune-mediated thrombocytopenia associated with solid tumors in dogs. *J Am An Hosp Assoc*. 1985; 21: 787-794.

Helfand SC, Jain NC, Paul M. Vincristine-loaded platelet therapy for idiopathic thrombocytopenia in a dog. 1984 *J Vet Med Assoc*; 185:

Honn KV, Cicone B, Skone, A. Prostacycline, a potent antimetastatic agent. *Science*, 1981; 212: 1270-1272.

Honn KV, Onoda PG, Menter PG, et al. Platelet-tumor cell interaction as a target for antimetastatic therapy. In: *Mechanisms of cancer metastasis*. Honn KV, Powers WE, Sloane BF (eds). Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 1986: 117-144.

Honn KV, Tang D G, Crissman J D. Platelets and cancer metastasis: A causal relationship?. *Canc Met Rev*, 1992, 11: 325-351.

Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki Y, Sakai K, Ruggeri ZM. The role of von Willebrand and fibrinogen under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991; 87: 1234-1240.

## Bibliografía.

Inaba K, Umeda Y, Yamana Y, Urakami M, Nada M. Characterization of human platelet vasopressin receptor and the relation between vasopressin-induced platelet aggregation and vasopressin binding to platelets. *Clin Endocrinol* 1988; 29: 377-386.

Ingerman-Wojensky CM. Simultaneous measurement of platelet aggregation and the release reaction in platelet-rich plasma and in whole blood. *J Med Tech* 1984; 1: 697-701.

Jackson CW, Edwards CC. Evidence that stimulation of megakariocytopoiesis by low dose vincristine results from an effect on platelets. *Br J Haematol.* 1977; 36:97-105.

Jancinova V, Nosal R, Petrikova M. Dose-response aggregometry. Contribution to the precise platelet function evaluation. *Thromb Res*, 1992; 65: 1-11.

Jans HE, Armstrong PJ, Price GS. Therapy of immune-mediated thrombocytopenia. A retrospective study of 15 dogs. *J Vet Intern Med* 1990; 4: 4-7.

Keravel O, Couto CG, Hammer AS. Disseminated intravascular coagulation in 50 dogs. *Proc. Am Vet Canc Soc, 13th Ann Conf.* 1993; 62-63.

Klinger MHF. Platelets and inflammation. *Anat Embriol* 1997; 196: 1-11.

Kristensen AT, Weiss DJ, Klausner JS. Platelet dysfunction associated with immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *J Vet Intern Med.* 1994; 8: 323-327.

Kukaszky G, Bodzenta- Kukaszky A, Gabrielewicz A, Bielawiec M. Platelet function in canine acute pancreatitis with reference to treatment with nafamostat mesilate (FUT-175). *Thrombos Res* 1992; 65: 229-239.

Lewis, D. C.; Meyers, K. L.; Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Vet Int Med* 1996; 4: 207-218.

## Bibliografía.

Mackin, A. Canine Immune- Mediated Thrombocytopenia. Part I. *Comp Cont Ed Pract Vet* 1995 (a); 3: 353-362.

Mackin, A. Canine Immune- Mediated Thrombocytopenia. Part II. *Comp Cont Ed Pract Vet* 1995 (b); 4: 515-535.

Mackin A J, Allen DG, Johnston IB. Effects of vincristine and prednisone on platelet numbers and function in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 1995; 50: 100-108.

Madewell BR, Feldman BF, O'Neil S. Coagulation abnormalities in dogs with neoplastic disease. *Thromb Haemostat* 1980; 44: 35-38.

Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res* 1997; 46 (1): 4-18.

Matera C, Falzarano C, Vaca C, Falciani M, Rossi F. Effects of some antineoplastic drugs (vincristine, doxorubicine and epirubicine) on human platelet aggregation. *J Med*, 1994; 25: 123-139.

McNeil EA, Oglivie GK, Fettman MJ, Salman MD. Platelet hyperfunction in dogs with malignancies. *J Vet Int Med* 1997; 11: 178-182.

Miller OV, Gorman RR. Evidence for distinct prostaglandin Y2 and D2 receptors in human platelets. *J Pharm Exp Ther* 1979; 210: 134-140.

Myrup B, Bregengaard C, Petersen LR, Winther K. Platelet aggregation and fatty acid composition of platelets on type one diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1991; 204:251-262.

Naschitz JE, Yeshurun D, Kev LM. Thromboembolism in cancer. Changing trends. *Cancer*, 1993; 71: 1384-1390.

Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events?. *Thromb Res* 1994; 74: Suppl 1 S3-S11.

Nguyen P, Petitfrere E, Potron G. Mechanisms of the platelet aggregation induced by activated neutrophils and inhibitory effect of specific PAF receptor agonists. *Thromb Res* 1995, 78: 33-42.

## Bibliografía.

Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995; 86: 4417-4421.

O'Donnell, M R, Slichter, SJ, Weiden P L, Storb R. Platelet and fibrinogen kinetics in canine tumors. *Cancer Research*, 1981, 41: 1379-1383.

O'Keefe DA, Couto, CG. Coagulation abnormalities associated with neoplasia. *Vet Clin North Am Small An Pract.* 1988; 18: 157-168.

Pierce KR, Marrs GE, Hightower D. Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. 1977 *Am J Vet Res*; 38: 1821-1825.

Ratzan R J; The mechanism responsible for vincristine (VCR) induced thrombocytopenia. *Blood* 1972; 40: 965.

Relford RL; Diagnosis of platelet disorders. *Sem Vet Med Surg (Small Animals)* 1992; 7: 323-329.

Remaley AT, Kennedy JM, Laposata M. Evaluation of clinical utility of platelet aggregation studies. *Am J Hematol.* 1989; 31: 188-193.

Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's Syndrome revisited. *Blood* 1983; 62: 14-31.

Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* 1991 (a); 78: 1730-1737.

Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 1991 (b); 78: 1760-1769.

Robertson JH, McCarhty GM. Periwinkle alkaloids and the platelet count. *Lancet* 1969; 16: 353-355.

Rowinsky E C, Donehower R C. Antimicrotubule Agent. In: Chabner BA Longo DA ed. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven. 1996; 263-296.

## Bibliografía.

Ruf A, Patschke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. 1995 *Semin Thromb Hemost*; 21: 146-151.

Ruggeri Z. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Hemost* 1993; 268: 12185-12192.

Ruggeri Z. New insights of platelet adhesion and aggregation. *Sem Hematol*. 1994; 3: 229-239.

Salzman AG, Morse B, Whitman MM, Ivanshchenko Y, Jaye M, Felder S. Cloning of the human serotonin 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1469-1487.

Schaffer AI, The hypercoagulable states. *Ann Int Med* 1985; 102: 814-828.

Schaffer AI. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol* 1995; 35: 209-219.

Schneider MR, Tang DG, Schirner M, Honn KV. Prostacyclin and its analogues: antimetastatic effects and mechanisms of action. *Canc Met Rev* 1994; 13: 349-364.

Schollmeyer JV, Rao GHR, White JG. An actin-binding protein in human platelets: interaction with alpha-actin and the influence of cytochalasin B. *Am J Patol*. 1978;93: 433.

Seen VM, Holmsen H, Aarbakke G. The platelet-stimulating effect of adrenaline through alpha 2-adrenergic receptors requires simultaneous activation by a true stimulatory platelet agonist. Evidence that adrenaline per se does not induce human platelet activation in vitro. *Thromb Haemost* 1993; 70: 506-513.

Slappendel RJ. Disseminated intravascular coagulation. *Vet Clin North Am (Small Anim Pract)* 1988; 18: 169-184.

## Bibliografía.

Soslau G, Arabe L, Parker J, Pelleg A. Aggregation of human and canine platelets: modulation by purine nucleotides. *Thromb Res*, 1993; 72: 127-137.

Steinherz PG, Miller DR, Hillgartner M W, Schmaltzer E A. Platelet dysfunction in vincristine treated patients. *Br J of Haematol*; 1976; 32: 439-450.

Stenberg P, McDonald T P, Jackson C W. Disruption of microtubules in vivo by vincristine induces large membrane complexes and other cytoplasmic abnormalities in megacaryocytes and platelets of normal rats like those in human and wistar furth rat hereditary macrothrombocytopenias. *J Cell Physiol*, 1995; 162: 86-102.

Steurer G, Kusnitz R, Pavelka M, Sinzinger H, Fritz E, Ludwig H. Early-onset thrombocytopenia during combination chemotherapy in testicular cancer is induced by vinblastine. *Cancer*, 1989; 1: 51-58.

Takahara K, Murray R, Fitzgerald GA, Fitzgerald DJ. Discrimination of two binding sites linked to distinct effector systems. *J Biol Chem* 1990; 265: 6836-6844.

Tanaka NG, Tohgo A, Ogawa H. Platelet-aggregating activities of metastasizing tumor cells. V. In situ roles of platelets in hematogenous metastases. *Inv Mets* 1986; 6: 209-224.

Thomas JS, McConnell MF, Bell TG, Padget GA. Platelet aggregation and dense granule secretion in a colony of dogs with spontaneous hypertension. *J Hypertens* 1992, 10: 1493-1498.

Tzanakakis. GN, Agarwal, KC; Vezeridis, MP. Prevention of human pancreatic cancer cell-induced hepatic metastasis by dipyridamole and its analog RA-233. *Cancer*, 1993; 71: 2466-2471.

Van Giezen JJJ, Jansen JWCM. Inhibition of fibrinolytic activity in vivo by dexamethasone is counterbalanced by an inhibition of platelet activation. *Thromb Haemost* 1992;68: 69-73.

## Bibliografía.

Vu TKH, Hung DT, Wheaton VI, Goughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991; 64: 1057- 1068.

Waltz, D. A. Thrombospondin as a mediator of cancer cell adhesion in metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1992, 11: 313-314.

Waner T, Harrus S, Bark H, Keysary A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 48: 177-182.

Weiss L, Orr FW, Honn KV. Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *FASEB J*. 1988; 2: 12-21.

Williams DA, Maggio-Price L. Canine idiopathic thrombocytopenia: Clinical observations and long-term follow-up in 54 cases. *J Am Vet Med Assoc*. 1984; 185: 660-663.

Willis SE, Jackson ML, Meric SM. Whole blood platelet aggregation in dogs with liver disease. *Am J Vet Res* 1989; 50: 1893-1897.

Wilson JF. Ehrlichia platys in a Michigan dog. *J Am An Hosp Assoc* 1992; 28: 381-383.

White JG. Platelet morphology. In: Johnson SA, ed. *The circulating platelet*. New York, NY: Academic press; 1971: 45.

White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman RW, Hirsch J, Marden VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*, third ed., Philadelphia, PA: Lippincot Company, 1994: 397-413.

White JG, Leistikov EL, Escolar G. Platelet membrane responses to surface and suspension activation. *Blood cells* 1990; 16: 43.

Yamamoto N, Greco NJ, Barnard MR, Tanoue K, Yamazaki H, Jamieson GA, Michelson AD. Glycoprotein Ib (GPIb)-dependent and GPIb-independent pathways of thrombin-induced platelet activation. *Blood* 1991; 77: 1740-1748.

## Bibliografía.

Yeon SA, Harrington WJ, Seelman RC, Eytel MD. Vincristine therapy of idiopathic and secondary thrombocytopenias. *N Engl J Med*, 1974; 291: 376-380.

Zhou W, Javors MA, Olson MS. Platelet-activating factor as an intercellular signal in neutrophil-dependent platelet activation. *J Immunol* 1992; 149: 1763-1769.