

## AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON CÁNCER

ENRIQUE RODRÍGUEZ  
GRAU-BASSAS

LAS METÁSTASIS DE TUMORES MALIGNOS SON UNA DE LAS CAUSAS MÁS FRECUENTES DE MUERTE TANTO EN HUMANOS COMO EN ANIMALES DE COMPAÑÍA CON CÁNCER. LAS PLAQUETAS JUEGAN UN PAPEL IMPORTANTE EN EL ASENTAMIENTO Y DESARROLLO DE LAS MISMAS. POR TANTO, LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD PLAQUETARIA PODRÍA REDUCIR LA PREVALENCIA Y GRAVEDAD DE ÉSTAS.

METASTATIC DISEASE IS ONE OF THE MOST COMMON CAUSES OF DEATH BOTH IN HUMAN AND IN COMPANION ANIMALS AFFECTED WITH CANCER. PLATELETS PLAY AN IMPORTANT ROLE IN TUMOR PROGRESSION AND METASTASIS. MODULATION OF PLATELET ACTIVITY MAY REDUCE THE PREVALENCE AND SEVERITY OF THOSE COMPLICATIONS.

### PRESENTACIÓN:

**E**n este trabajo se evalúan los efectos de las neoplasas malignas, inflamaciones crónicas y un quimioterápico frecuentemente utilizado, en la funcionalidad plaquetaria, mediante la técnica de agregometría.

### INTRODUCCIÓN

Las plaquetas o trombocitos, las más pequeñas de las células sanguíneas, además de su conocido papel en la coagulación sanguínea desempeñan otra serie de importantes misiones según se ha puesto de manifiesto en las últimas décadas. En primer lugar, las plaquetas interactúan con otras células inflamatorias, como neutrófilos y macrófagos, modulando la actividad de éstas en ambos sentidos. Además, su intervención se ha demostrado como decisiva en diversos procesos patológicos, como el síndrome de distrés respiratorio o la enfermedad de Crohn en humanos.

Por otra parte, ciertos aspectos de las metástasis de tumores malignos necesitan de la presencia y actividad plaquetaria para desarrollarse. Según se ha descrito ampliamente en la literatura especializada, al inyectar células tumorales a animales de experimentación, su asentamiento y desarrollo (metástasis) se reducía notablemente si el animal había sido previamente privado de sus plaquetas,

o si la actividad de éstas se atenúa mediante ciertos fármacos. Estas reducciones, que en ocasiones superaron el 90%, no se han reproducido de forma satisfactoria en pacientes humanos o caninos con tumores espontáneos, sin que hasta el momento se hayan aclarado completamente las causas.

En base a lo expuesto, la investigación de la actividad plaquetaria, de las condiciones patológicas que la exacerban o atenúan y de los fármacos capaces de inhibir su actividad, es de gran importancia tanto en oncología como en otros campos de la medicina.

La investigación clínica, esto es, en pacientes reales con enfermedades de presentación espontánea no inducidas experimentalmente, puede aportar una considerable información a ciertos campos de la medicina humana, especialmente a la oncología, ya que gran parte de las investigaciones en ese sentido se realizan fundamentalmente en roedores de laboratorio, con células tumorales procedentes de cultivos celulares, con lo que la situación así creada puede llegar a alejarse de la realidad clínica. La incidencia de cáncer en los animales de compañía va en aumento, posiblemente por estar sometidos a nuestras mismas condiciones de vida y medioambientales, por lo que las observaciones realizadas en ellos pueden aportar una valiosa información para el estudio de dicho proceso morboso en los humanos.



CARCINOMA MAMARIO MALIGNO EN UNA DE LAS PACIENTES DEL ESTUDIO

Paralelamente, ha aumentado el número de animales de compañía que reciben tratamientos quirúrgicos y/o farmacológicos para sus neoplasias malignas y el estudio de su respuestas y evolución no debe desaprovecharse.

Hasta el momento no abundan 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.

Por último, la actividad y número plaquetario son dos factores que se ven afectados por el empleo de vincristina, un alcaloide extraído de una planta, la *Catharanthus roseus* G Don (antes *Vinca rosea* Linn.) frecuentemente empleado como agente quimioterápico en el tratamiento de diversas neoplasias y como estimulante de la producción de plaquetas en las trombocitopenias inmuno-mediadas (TIM), procesos en que el propio organismo destruye las plaquetas, dando lugar a graves complicaciones hemorrágicas (Yeon, 1974; Jackson y Edwards, 1977; Green et al., 1982). Los alcaloides de la *Vinca* ejercen su acción como agentes antimicrotubulares y como tales se les clasifica. Siendo los microtúbulos unas estructuras muy abundantes y altamente funcionales en el citoesqueleto de la plaqueta, es lógico pensar que el empleo de este compuesto en un paciente pueda producir alteraciones en la morfología y actividad éstas células (Steinhertz, 1976, Bee, 1980; Stenberg et al, 1995).

Creímos por tanto 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 TIM, e indirectamente su potencial efecto inhibidor 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.

#### 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.

#### DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO:

Este estudio se compone de dos partes bien diferenciadas, tanto desde el punto de vista de los pacientes estudiados, como de la interpretación y estudio de los resultados obtenidos. La primera parte consistió en la

**ESTE ESTUDIO SE COMPONE DE DOS PARTES BIEN DIFERENCIADAS, TANTO DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS, COMO DE LA INTERPRETACIÓN Y ESTUDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.**



CARCINOMA CUTÁNEO EN UNO DE LOS CASOS ESTUDIADOS

comparación de los efectos en la agregación plaquetaria de neoplasias malignas e inflamaciones crónicas entre sí y con un tercer grupo de control formado por animales sanos. En la segunda, se evaluaron los efectos de la vincristina en 7 pacientes caninos con linfoma maligno (LSA), es decir cada uno de estos perros fue comparado consigo mismo antes y después de la administración del citado fármaco. Ambas partes, por tanto, se describen por separado.

### 1. EFECTOS DE NEOPLASIAS MALIGNAS Y PROCESOS INFLAMATORIOS CRÓNICOS EN LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los animales incluidos en el estudio fueron pacientes del Hospital Veterinario Docente de la Universidad del Estado de Ohio (UEO).

La actividad plaquetaria puede evaluarse por distintos medios, que podemos simplificar en tres grupos. El primero y por más tiempo empleado es la agregación plaquetaria "in vitro", que consiste en hacer reaccionar a las plaquetas mediante ciertas substancias biológicas llamadas agonistas, de manera que con un aparato llamado agregómetro podemos determinar la capacidad de respuesta a dichos agonistas. Este método puede realizarse en sangre completa o en plasma rico en plaquetas, obtenido por separación de la mayor parte de éstas del resto de elementos formes.

El segundo método de evaluación es la citometría de flujo, técnica muy sensible que detecta los cambios morfológicos que experimentan los trombocitos al iniciar su actividad. Por último, la detección de marcadores de actividad plaquetaria,

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		HE	LSA	326000
5	Shar-Pei		HE	HSA	200000
6	Mestizo	15	HE	MC III	290000
7	Boxer	6	H	ADC man	340000
8	Caniche	7	HE	ADC man	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 he atocel.	364000
15	Mestizo	12	MC	ADC he atocel.	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 2.** 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 MALIGNO, HSA= HEMANGIOSARCOMA, HP= HEMANGIOPERICITOMA, LSA= LINFOSARCOMA, MC= MASTOCTOMA. I, II, III= GRADO I, II o III

como lo son por ejemplo las p-selectinas, consiste en determinar en la superficie plaquetaria la existencia de determinadas proteínas que solo se exteriorizan al activarse estas células. Al ser estas dos técnicas de introducción relativamente reciente, no se disponía de suficientes datos comparativos en la literatura veterinaria, por lo que optamos por la agregometría "in vitro" técnica que además había sido utilizada en numerosas experiencias anteriores por el grupo investigador de Facultad de Medicina Veterinaria de la UEO con que desarrollamos nuestras investigaciones.

a) Selección de pacientes. Los perros de este estudio se incluyeron en uno de los tres grupos siguientes:

**Grupo 1.** Dieciséis perros sanos, llevados al Hospital Veterinario Docente de la UEO para chequeos y/o procedimientos quirúrgicos rutinarios.

**Grupo 2.** Seis perros con enfermedades inflamatorias crónicas (Tabla 2).

**Grupo 3.** Veintiún perros con neoplasias malignas, confirmadas por diagnóstico citológico y/o histopatológico (Tablas 1 y 2).

Ninguno de los pacientes aquí incluidos había recibido medicación alguna durante las últimas tres semanas y había ayunado al menos doce horas antes de la extracción de la muestra.

b) Toma de muestras. A cada uno de los animales se les extrajo al menos 4'5 ml. de sangre de una vena yugular,

Variable	Pre VCR		Post VCR		p-valor
	Media	SD	Media	SD	
Plaquetas ( $\mu$ L)	289,000	79,353	331,714	89,734,26	0,06
1/2 T Max Ag ADP	0,31	0,31	0,19	0,11	0,48
1/2 T Max Ag COL	1,17	1,17	0,81	0,76	0,25
1/2 T Max Ag AA	1,45	2,82	0,36	0,34	0,50
Slope ADP	54,29	31,87	27,86	12,28	0,02 *
Slope COL	52,43	45,51	21,43	22,63	0,06
Slope AA	34,86	34,10	19,00	11,34	0,25
Max ADP	60,43	30,76	32,57	23,29	0,03 *
Max COL	52,43	45,51	27,57	34,37	0,04 *
Max AA	67,71	30,99	42,14	31,44	0,03 *

**Tabla 1.** MEDIAS Y DESVIACIONES TÍPICAS (SD) DE RECUENTOS PLAQUETARIOS EN PRD, TIEMPO HASTA LA MITAD DE LA AGREGACIÓN MÁXIMA PENDIENTE Y AGREGACIÓN MÁXIMA. LOS ASTERISCOS INDICAN SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA

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 estudio. La muestra así obtenida se depositó cuidadosamente en un tubo de cristal siliconizado con 0,5 ml de citrato sódico al 3,8% (Venoject, Terumo, Elkton, Md, EE UU).

**c) 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 poliestireno con tapa, donde se dejaba reposar durante una hora a temperatura ambiente.

**d) 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 poliestireno.

**e) 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).

**f) 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 velocidad de rotación de

los pocillos se ajustó a 900 r.p.m. y se colocaron 200 µL 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 µL 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 barra 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 µL de cada uno de los siguientes agonistas: ADP a una concentración de  $2 \times 10^{-4}$  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.

**g) 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 (Slope), 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. Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente por métodos adecuados.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 1 a 3. Todas las muestras agregaron en presencia del ADP pero la respuesta a los otros dos agonistas fue menos uniforme. En todos los casos, la potencia de la prueba, esto es, la

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

TABLA 3. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES.  
LEYENDA: VER TABLA 2

**LOS TROMBOEMBOLISMOS COMO COMPLICACIÓN EN PACIENTES CANINOS CON CÁNCER NO ESTÁN TAN AMPLIAMENTE DESCRITOS EN PERROS COMO LO ESTÁN EN PACIENTES HUMANOS AFECTADOS DE DICHA ENFERMEDAD**



PACIENTE CANINO AFECTADO DE LINFOMA

probabilidad de detectar diferencias entre los grupos estudiados, expresada en tantos por ciento fue inferior al valor deseado de 0'800. En todos los casos en que el valor de la potencia es inferior a 0'800, los resultados negativos deben evaluarse con reservas.

### DISCUSIÓN

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los patrones de agregación entre ninguno de los tres grupos estudiados.

Sin embargo, las diferencias entre grupos podrían haber sido significativas si se hubiesen evaluado más pacientes caninos con enfermedades inflamatorias crónicas. Esto no pudo conseguirse debido a la dificultad de encontrar este tipo de pacientes en un Hospital básicamente de referencia, en el que la mayoría de los pacientes han sido sometidos a varios tratamientos antes de ser remitidos al mismo.

Si bien en un estudio realizado sobre 100 perros con cáncer sin alteraciones hemostáticas aparentes desde el punto de vista clínico, 83 presentaron anomalías en alguna prueba de coagulación, no se evaluó aquí la funcionalidad plaquetaria (Madewell et al, 1980). En un estudio más reciente (McNeil et al, 1997), se demostró la existencia de una mayor agregabilidad plaquetaria en sangre completa de perros con cáncer. Los mecanismos por los que los tumores malignos ejercen su influencia en los sistemas de coagulación no han sido completamente aclarados, aunque varios se han propuestos y confirmado experimentalmente (Gassic et al, 1976; Honn et al 1986; Waltz, 1992 ). La agregación plaquetaria inducida por células tumorales se ha puesto de manifiesto tanto en vivo como "in vitro"; la intensidad de la agregación parece ser directamente proporcional a la capacidad de metastatizar del tumor (Honn et al, 1992). Además, los recuentos plaquetarios y los tiempos de supervivencia están influenciados por

el tipo y extensión del tumor (O'Donnell et al, 1981). Otros mecanismos asociados a tumores e involucrados en el desarrollo de metástasis pueden no afectar directamente a las plaquetas, sino actuar directamente sobre las interacciones célula tumoral-célula endotelial-matriz extracelular. El bloqueo de esta fase es uno de los objetivos de los tratamientos antimetastásicos (Schneider et al, 1994).

Los tromboembolismos como complicación en pacientes caninos con cáncer no están tan ampliamente descritos en perros como lo están en pacientes humanos afectados de dicha enfermedad. Se han propuesto tres mecanismos como explicación de este proceso:

a) Daño al endotelio vascular, bien por traumatismo directo de las células tumorales, menos deformables que las células normales, que al quedar encajadas en estrechos capilares dan lugar a la activación del sistema de coagulación así como al desencadenamiento de diversas reacciones inflamatorias, o por la presencia de vasos intratumorales con endotelio incompleto.

b) Agregación plaquetaria inducida por células tumorales cuya intensidad, como se describe más arriba, vendría determinada por tipo y extensión del tumor.

c) Activación directa de la coagulación, bien desencadenando primariamente la cascada o bien suprimiendo los anticoagulantes naturales (Schneider et al, 1994).

En la especie humana, la aparición de cuadros tromboembólicos puede preceder, e incluso hacer sospechar la existencia de un proceso canceroso, meses o años antes de que este último sea detectable por cualquier método diagnóstico. La prevalencia de tromboembolismos en pacientes humanos cancerosos es más alta en ciertos tipos de tumores, como los adenocarcinomas gástricos secretores de mucina y otros tumores mamarios,

prostáticos o pancreáticos. (Schneider et al, 1994; Rickles y Edwards, 1983).

Por tanto, el tipo, extensión y vascularización del tumor, grado de alteración del endotelio vascular intratumoral y traumatización del endotelio por parte de las células tumorales, junto con la presencia o ausencia de metástasis pueden haber afectado en mayor o menor grado a la función plaquetaria y ser parcialmente responsables de la variabilidad existente dentro los perros incluidos en el grupo 3 (Weiss et al, 1988). Debe además considerarse el hecho de que la agregometría puede no poseer la sensibilidad suficiente para detectar todo tipo de alteraciones de la función plaquetaria.

Como se apuntó antes, en nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos evaluados, si bien un mayor número de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas podría haber dado lugar a diferente resultado, por lo que parece verse en la mayoría de estos, ya que en varios casos mostraron una mayor agregabilidad que la apreciada en los pacientes de los restantes grupos y la única variable en que se observó significación estadística fue en este sentido. Sin embargo, y basándonos estrictamente en nuestros resultados, la presencia de inflamaciones crónicas no parece afectar la agregación plaquetaria en perros, aunque estudios futuros evaluando un mayor número de pacientes de esta especie usando agregometría y demás técnicas "in vitro" u otros métodos para detectar la presencia de plaquetas circulantes en estado activado daría muy probablemente otros resultados (Mannaioni et al, 1997).

Nuestros hallazgos contrastan con los obtenidos en un estudio previo en el cual se observó hiperagregabilidad en perros con neoplasias malignas mediante agregometría en sangre

completa (McNeil et al, 1997). Las citadas diferencias se deben probablemente al empleo de diferente metodología (agregometría en sangre completa o en plasma rico en plaquetas). No debemos olvidar el hecho de que no existe el método ideal para evaluación de función plaquetaria y que en ningún caso de los dos estudios, los pacientes mostraron alteraciones hemorrágicas o tromboembolismos clínicamente apreciables, por lo que es difícil determinar si evidentemente hay anomalías en la función plaquetaria de perros con neoplasias malignas. En consecuencia, el empleo de las nuevas técnicas antes descritas, conjuntamente con la agregometría en plasma rico en plaquetas o en sangre completa, pueden ser el único camino razonable para dar una respuesta precisa a la existencia o no de anomalías en la función plaquetaria de perros con cáncer.

**2. EFECTOS DE LA VINCISTINA SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS CON LINFOMA**

Como se describe en la introducción, esta parte del estudio tiene por objeto evaluar los efectos de una dosis terapéutica de vincristina en la agregación plaquetaria de perros con LSA, una frecuente neoplasia de células linfáticas. Pero el hecho que determina el diseño y ejecución de este aspecto en nuestra investigación es una observación realizada por uno de los autores de la misma (C. G. Couto) en base a la cual, al administrar vincristina a perros con trombocitopenias inmunomediadas, alguno de estos animales mostraba un agravamiento transitorio del cuadro hemorrágico, a pesar del aumento apreciable del número de trombocitos en sangre. En un intento de responder a esta incógnita discutida desde hace años, decidimos observar el efecto del fármaco en una situación clínica que, si bien es diferente, podría aportar una interesante información.



PERRA CON MÚLTIPLES TUMORES MAMARIOS

LA PRESENCIA DE INFLAMACIONES CRÓNICAS NO PARECE AFECTAR LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PERROS, AUNQUE ESTUDIOS FUTUROS EVALUANDO UN MAYOR NÚMERO DE PACIENTES DE ESTA ESPECIE DARÍA MUY PROBABLEMENTE OTROS RESULTADOS

Hemos de aclarar que evaluar función plaquetaria en perros trombocitopénicos, usando plasma rico en plaquetas, conllevaría la extracción de unos volúmenes de sangre difícilmente obtenibles sin comprometer en muchos casos la vida de estos pacientes. Recordemos que sólo evaluamos en nuestro trabajo pacientes con dueño que acudían al Hospital Docente de la OSU y que en ningún momento se emplearon animales de experimentación.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de pacientes. Siete perros, presentados a consulta en el Servicio de Oncología y Hematología del Hospital Veterinario Docente de la OSU se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: Todos fueron diagnosticados de LSA por examen cito y/o histológico; dicha neoplasia se hallaba en todos los casos en fase de remisión, esto es no presentaban sintomatología clínica alguna relacionada con el citado proceso; estaban sometidos a un protocolo quimioterápico que incluyese vincristina (Vincristina, sulfato, Oncovin, Elly Lilly and Co., Indianapolis, IN EE UU), habían ayunado por lo menos 12 horas previas a la obtención de la primera muestra y no presentaban ninguna otra anomalía clínica ni hematológica.

La primera muestra (Pre-VCR) era extraída de la yugular después de completar un examen físico sin incidencias. Tras la obtención de un hemograma completo y perfil bioquímico normales, se les administró VCR a una dosis de 0.5 mg/m<sup>2</sup>, en forma de bolo intravenoso, utilizando a tal fin una vena cefálica. Una hora más tarde se extraía la segunda muestra (Post VCR) de la otra yugular.

Seis de los pacientes habían sido diagnosticados de LSA multicéntrico y el otro de LSA gastrointestinal. Los siete recibían un protocolo poliquimioterápico denominado COAP (Ciclofosfamida, VCR, arabinósido de citosina y prednisona).

El procesamiento de las muestras y el método de agregación fueron idénticos a los descritos en los apartados

correspondientes de la sección I de este artículo. El análisis estadístico consistió en una prueba de Wilcoxon para datos pareados.

#### RESULTADOS

Se resumen en la tabla 1 y se describen en las figuras 1 a 3.

#### DISCUSIÓN

Hemos observado una disminución significativa tanto en la agregación máxima como en la pendiente tras la administración de una dosis terapéutica de VCR a perros con LSA. Estos resultados contrastan con los descritos por Mackin et al (1995) en perros normales a los que se les había administrado VCR. Aunque la metodología en dicho estudio fue similar a la empleada por nosotros, diversos factores fueron diferentes. Por ejemplo, sólo uno de los agonistas (ADP) se empleó en ambos estudios e incluso en este caso, las concentraciones finales utilizadas fueron diferentes. Además, los intervalos de tiempo en que se obtuvieron las muestras fueron notablemente diferentes. Estos autores extrajeron sangre de sus perros entre uno y diez días tras la administración del fármaco, mientras que nosotros lo hicimos una hora después. El retraso en la obtención de las muestras puede dar lugar a la liberación de nuevas plaquetas, quizá más competentes desde el punto de vista hemostático. Los cambios inducidos por la VCR ocurren rápidamente (Stemberg et al, 1995) y además está demostrado que el fármaco que nos ocupa estimula la liberación de plaquetas desde los megacariocitos (Green et al, 1985). Debido a estos efectos, puede tener lugar la liberación de nuevas y más activas plaquetas sin que se produzca un incremento apreciable de éstas en perros con TIM ya que las plaquetas afectadas podrían ser fagocitadas por los macrófagos. Estos últimos, al ingerir plaquetas conteniendo VCR pueden experimentar una disminución de su actividad fagocítica, siendo éste el mecanismo de acción propuesto para la VCR en TIM. Como comentamos más arriba, los efectos negativos de la VCR no tienen que dar lugar

necesariamente a hemorragias espontáneas en perros no trombocitopénicos, si bien esto es factible en animales con un bajo recuento plaquetario.

La irreversibilidad de la disfunción plaquetaria inducida por VCR ha sido bien documentada, así como su correlación con un progresivo deterioro morfológico (Stenberg, 1995). La realización de un estudio en el cual las muestras se extraigan a intervalos determinados durante las 24-48 horas siguientes a la administración de fármaco, puede aclarar estos aspectos. Sin embargo, el ser nuestro estudio realizado en animales de compañía en régimen ambulatorio, no era ése un diseño práctico ni factible. Nuestros resultados soportan la observación clínica de que la VCR puede inducir hemorragias espontáneas transitorias debido a una alteración funcional en las plaquetas.

#### BIOGRAFÍA

##### ENRIQUE RODRÍGUEZ GRAU-BASSAS

Licenciado en Veterinaria por la Facultad de Veterinaria de Córdoba en 1981. Ejercicio libre como veterinario especialista en animales de compañía desde 1981 hasta 1995. Profesor asociado de la Facultad de Veterinaria desde 1989. Becado por la ULPGC en 1990 para realizar un estancia en el Hospital Veterinario Docente de la Universidad de California (Davis) y en 1992 en el Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Agropecuaria de Suecia. Becado por la Fundación Universitaria de Las Palmas de G. C. para realización de la Tesis Doctoral. Doctorado en Veterinaria por la ULPGC en 1998. Actualmente imparte docencia de Radiología Clínica, Oncología y Cirugía Oncológica. Paralelamente trabaja en la investigación de fármacos inhibidores de las metástasis y como cirujano en el Hospital Veterinario de la ULPGC con especial interés en la cirugía oncológica.

Dirección: Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria. Carretera de Trasmontaña, s/n, 35416 Arucas. Teléfono: 928 45 11 18. E-mail: erg@step.es

#### BIBLIOGRAFÍA

- Bee D, Leach E, Martin JF, Sugget AJ. (1980): "The effect of vincristine on platelet aggregation studied by a filter loop technique in the rat", *Br. J. Pharmacol*, n. 69, 227-231.
- Gassic GJ, Koch PAG, Hsu B. (1976): "Thrombogenic activity of mouse and human tumors: Effects on platelets, coagulation, and fibrinolysis, and possible significance for metastases", *Z Krebs Forsch*; 86, 263-277.
- Green CE, Scoggin J, Thomas JE, Barsanti JE. (1982): "Vincristine in the treatment of thrombocytopenia in five dogs" *J Am Vet Med Assoc.*, 180,140-143.
- Honn KV, Onoda PG, Menter PG, et al.(1986): "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, 117-144.
- Mackin A.J, Allen DG, Johnston IB. (1995): "Effects of vincristine and prednisone on platelet numbers and function in clinically normal dogs", *Am J Vet Res.* 50, 100-108.
- Madewell BR, Feldman BF, O'Neil S. (1980): "Coagulation abnormalities in dogs with neoplastic disease" *Thromb Haemostat*, 44: 35-38.
- Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. (1997): "Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine" *Inflamm Res*, 46 (1), 4-18.
- McNeil EA, Oglivie GK, Fettman MJ, Salman MD. (1997): "Platelet hyperfunction in dogs with malignancies", *J Vet Int Med*, 11, 178-182.
- O'Donnell, M R, Slichter, SJ, Weiden P L, Storb R. (1981): "Platelet and fibrinogen kinetics in canine tumors", *Cancer Research*, 41, 1379-1383.
- Rickles FR, Edwards RL. (1983): "Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's Syndrome revisited" *Blood*, 62, 14-31.
- Schneider MR, Tang DG, Schirmer M, Honn KV. (1994): "Prostacyclin and its analogues: antimetastatic effects and mechanisms of action", *Canc Met Rev*; 13, 349-364.
- Stenberg P, McDonald T P, Jackson C W. (1995): "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 macrothrombo-cytopenias", *J Cell Physiol*, 162, 86-102.
- Weiss L, Orr FW, Honn KV. (1988): "Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis", *FASEB J.*, 2, 12-21.