



**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS**



**FASES DE LA HEMOSTASIA EN RATAS DE LABORATORIO DE LAS LÍNEAS
BIOU:WISTAR Y BIOU:SPRAGUE DAWLEY.**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo Presentado ante la Ilustre Universidad de Los Andes para optar al Título de
Licenciada en Bioanálisis

Autor: Navas Quintero Lilibeth Andreina.
C.I: 17.340.477

Tutor: Prof. Belkis Quiñonez

Cotutor: Prof. Katusca Villasana

Mérida, abril 2021.

DEDICATORIA

Hoy, al alcanzar una de mis metas luego de recorrer un largo camino con constancia, dedicación y esfuerzo, deseo dedicarle este triunfo:

A Dios Todopoderoso, por darme el privilegio de vivir y de iluminarme en mi camino, enviándome el don de la inteligencia y la sabiduría para saber que sendero elegir.

A mi Papá y Mamá, quien con mucho sacrificio y esfuerzo me han ayudado y apoyado en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, aunque tarde les doy esta alegría espero que estén orgullosos de mí.

A mis hermanos Tahelys, Héctor y Miguel, quienes de una u otra manera me han apoyado en el camino, este logro también es de ustedes.

A mi hijo Héctor Andrés, por quien hago todo lo que hago este logro es por y para ti, que te sirva de ejemplo de lucha y perseverancia en las metas que te desees trazar en la vida
TE AMOOOOOO.

A Héctor Sánchez, gracias por el apoyo y la ayuda que me diste en toda mi carrera, en las altas y bajas estuviste conmigo.

Lilbeth Navas

AGRADECIMIENTO

A Dios y la Virgen, y al Santo niño de la Cuchilla por no dejar que decayera, son mi mayor fuente de sabiduría. Eternamente agradecida.

A mis compañeras de estudio, con quienes compartí grandes momentos a lo largo de esta etapa: Yzamar, Zurima, Osmary, Cindy, Andrea. Éxitos amigas.

A mi tutora Profesora Belkis Quiñonez, por confiar en mí y aceptarme como su tesista brindándome nuevos conocimientos para lograr esta meta tan anhelada, admiro su vocación al trabajo que desempeña. **Dios le pague.**

A la profesora Katusca Villasana, por su dedicación y tiempo en el logro de esta meta. **Gracias.**

A la ilustre Universidad de Los Andes, por permitir formarme en mi carrera impartiendo sus conocimientos y apoyándome en etapas claves.

A quienes de una u otra manera me apoyaron desde el comienzo y otros que se unieron en el camino, gracias por estar allí cuando lo necesitaba. **Gracias y Éxitos.**

Lilibeth Navas

Índice de Contenido

	Pág
<i>Índice de tablas</i>	<i>vii</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>viii</i>
<i>Índice de gráficos</i>	<i>ix</i>
<i>Resumen</i>	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	
<i>Planteamiento del Problema</i>	<i>4</i>
<i>Justificación e Importancia de la Investigación</i>	<i>7</i>
<i>Objetivos de la Investigación</i>	<i>8</i>
<i>Objetivo General</i>	<i>8</i>
<i>Objetivo Específico</i>	<i>8</i>
<i>Alcances y Limitaciones de la Investigación</i>	<i>9</i>
<i>Alcances de la Investigación</i>	<i>9</i>
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	<i>9</i>
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
<i>Trabajos Previos</i>	<i>10</i>
<i>Bases Teóricas</i>	<i>15</i>
<i>Hemostasia</i>	<i>15</i>
<i>Fases de la Hemostasia</i>	<i>16</i>
<i>Hemostasia Primaria</i>	<i>17</i>
<i>Factor de Activación Plaquetaria (FAP)</i>	<i>18</i>
<i>Papel del FAP en la formación del trombo</i>	<i>18</i>
<i>Hemostasia Secundaria o Coagulación</i>	<i>20</i>

<i>Factores de la Coagulación</i>	25
<i>Trastornos de la Hemostasia.....</i>	27
<i>Pruebas de laboratorio para el control de la hemostasia Primaria y Secundaria</i>	28
<i>Tiempo de Sangría.....</i>	29
<i>Recuento o Contaje Plaquetario</i>	30
<i>Retracción del Coagulo</i>	31
<i>Tiempo Parcial de Tromboplastina activado (TPTa).....</i>	34
<i>Tiempo de Protrombina (TP)</i>	34
<i>Índice Normalizado Internacional (INR)</i>	35
<i>Tiempo de Coagulación.....</i>	36
<i>Tiempo de Coagulación de Lee-White.....</i>	37
<i>Tiempo de Coagulación de Milian</i>	37
<i>El tiempo de Coagulación de Burker</i>	37
<i>Tiempo de Trombina.....</i>	37
<i>Fibrinógeno</i>	38
<i>Ratas de Laboratorio.....</i>	39
<i>Ratas Wistar</i>	41
<i>Ratas Sprague Dawley</i>	45
 CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	
<i>Tipo de Investigación</i>	48
<i>Diseño de la Investigación</i>	49
<i>Población y Muestra.....</i>	49
<i>Unidad de Investigación.....</i>	49
<i>Selección del Tamaño de la Muestra.....</i>	50
<i>Sistema de Variables</i>	50

<i>Instrumento de Recolección de Datos</i>	50
<i>Procedimiento de la Investigación</i>	51
1. <i>Inducción de la Anestesia</i>	51
2. <i>Pruebas de Hemostasia</i>	52
2.1. <i>Tiempo de Sangría</i>	52
2.2 <i>Contaje Plaquetario</i>	54
2.3 <i>Tiempo de Protrombina (Método de Quick)</i>	56
2.4 <i>Tiempo Parcial de Tromboplastina activado</i>	58
2.5 <i>Tiempo de Coagulación</i>	60
2.6 <i>Fibrinógeno</i>	61
2.7 <i>Aspectos Bioéticos</i>	62
<i>Diseño de Análisis</i>	62
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
<i>Resultados</i>	64
<i>Discusión</i>	73
CAPITULO V: CONCLUSION Y REFERENCIAS	
<i>Conclusion</i>	80
<i>Recomendaciones</i>	81
<i>Referencias</i>	82

Índice de Tablas

	<i>Pág</i>
<i>Tabla.1 Funciones de los factores de la Coagulación.....</i>	26
<i>Tabla. 2 Trastornos de la Hemostasia Primaria.....</i>	27
<i>Tabla.3 Trastornos de la hemostasia Secundaria.....</i>	28
<i>Tabla 4. Parámetros Biológicos de Ratas Wistar.....</i>	44
<i>Tabla 5. Parámetros Biológicos de Ratas Sprague Dawley.....</i>	47
<i>Tabla 6. Tiempo de sangría (min) en Ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley ...</i>	65
<i>Tabla 7. Número de plaquetas en Ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley.....</i>	66
<i>Tabla 8. Tiempo de Protrombina (segundos) en Ratas</i>	67
<i>Tabla 9. Tiempo Parcial de Tromboplastina activado (segundos) en ratas.....</i>	68
<i>Tabla 10. Tiempo de Coagulación en Ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley. .</i>	70
<i>Tabla 11. Fibrinógeno (%) en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley.....</i>	71

Índice de figuras

	<i>Pág</i>
<i>Figura 1. Hemostasia Primaria. Activación y agregación Plaquetaria.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2. Hemostasia secundaria. Vías de la coagulación sanguínea.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3. Fibrinólisis.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 4. Prueba del Coagulograma, para la valoración de la Actividad Plaquetaria.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 5. Pruebas del Coagulograma para la valoración de la Hemostasia Secundaria.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 6. Rata Wistar. Tomado de Milind y Renu, 2013.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 7. Rata Sprague Dawley. Tomado de Taconic Biosciences.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 8. Rata BIOU:Wistar.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 9. Rata BIOU: Sprague Dawley</i>	<i>49</i>
<i>Figura 10. Sedación con Halotano al 100%.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 11. Anestesia con ketamina más xilacina</i>	<i>52</i>
<i>Figura 12. Corte en la porción distal de la cola de las ratas del estudio.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 13. Secado de la cola con papel filtro</i>	<i>54</i>
<i>Figura 14. Muestra en cámara de Neubauer</i>	<i>55</i>
<i>Figura 15. Contaje de plaquetas</i>	<i>55</i>
<i>Figura 16. Muestra de suero de los 10 animales</i>	<i>57</i>
<i>Figura 17. Baño de Maria seco a 37⁰C.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 18. Formación del coagulo. Tiempo Protrombina</i>	<i>58</i>
<i>Figura 19. Reactivos de Tiempo parcial de tromboplastina activado</i>	<i>58</i>
<i>Figura 20. Formación del Coágulo.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 21. Determinación del Tiempo de Coagulación.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 22. Técnica de determinación del Fibrinógeno.....</i>	<i>61</i>

Índice de Gráficos

	Pág
<i>Gráfico 1. Tiempo de Sangría (min) en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley .65</i>	.65
<i>Gráfico 2. Contaje Plaquetario en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley... ..66</i>	66
<i>Gráfico 3. Tiempo de Protrombina en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley .. 68</i>	68
<i>Gráfico 4. Tiempo Parcial de Tromboplastina activado en ratas 69</i>	69
<i>Gráfico 5. Tiempo de coagulación en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley ... 71</i>	71
<i>Gráfico 6. Fibrinógeno (%) en ratas ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley..... 72</i>	72

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES



**FASES DE LA HEMOSTASIA EN RATAS DE LABORATORIO DE LAS LÍNEAS
BIOU: WISTAR Y BIOU: SPRAGUE DAWLEY.**

Trabajo Presentado ante la Ilustre Universidad de Los Andes para optar al Título de
Licenciada en Bioanálisis

Autor: Lilibeth A. Navas Q.
C.I: 17.340.477

Tutor: Prof. Belkis Quiñonez.

Cotutora: Prof. Katusca Villasana

RESUMEN

La hemostasia es el proceso fisiológico que detiene la pérdida sanguínea, comprende la hemostasia o fase primaria en la que se forma el tapón plaquetario, y la hemostasia secundaria que corresponde a la formación del coágulo de fibrina durante el proceso de coagulación sanguínea. Las ratas de laboratorio Wistar y Sprague Dawley son ampliamente usadas para estudiar las fases de la hemostasia; sin embargo, se han demostrado diferencias en varios procesos fisiológicos entre estas dos líneas de animales. **OBJETIVO:** Comparar de qué manera se corresponden las fases de la hemostasia, en ratas de laboratorio de las líneas BIOU: Wistar y BIOU:Sprague Dawley. **METODOLOGÍA:** Se utilizaron 10 ratas BIOU:Wistar y 10 ratas BIOU:Sprague Dawley producidas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes, con peso corporal comprendido entre 370 y 400 g, se determinó: tiempo de sangría, contaje plaquetario, tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa), tiempo de coagulación y fibrinógeno. **RESULTADOS:** El tiempo de sangría y el TP fueron significativamente menores en las ratas BIOU:Sprague Dawley ($p=0,002$ y $p=0,011$ respectivamente). No hubo diferencia significativa en el contaje plaquetario, TPTa, tiempo de coagulación y fibrinógeno entre ambas líneas de ratas ($p>0,05$) **CONCLUSIÓN:** Se evidenciaron diferencias entre las ratas de laboratorio BIOU:Sprague Dawley y BIOU:Wistar, tanto en la hemostasia primaria como en la hemostasia secundaria; específicamente el tiempo de sangría y el TP fueron significativamente menores en las ratas BIOU:Sprague Dawley. Las diferencias halladas podrían explicarse por variaciones en las bases genéticas de cada línea de ratas, que influyen en la función plaquetaria o en la expresión y/o actividad de los factores de coagulación, proteínas anticoagulantes y componentes del sistema fibrinolítico.

Palabras clave: Hemostasia primaria, hemostasia secundaria, coagulación, pruebas de hemostasia, ratas Wistar, ratas Sprague Dawley.

INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un mecanismo fisiológico que se encarga de la detención del sangrado, ocurre normalmente en pacientes sin compromiso sistémico y se ve afectado en pacientes con patologías, por ejemplo, aquellos que se encuentran medicados con tratamiento anticoagulante y anti plaquetario. En estas condiciones, el organismo no puede provocar por sí solo el cese de una hemorragia, y por tanto, es necesario valerse de un mecanismo alternativo que potencie tal situación, en este caso el uso de fármacos hemostáticos representan una herramienta terapéutica factible (González y Parra, 2011).

No debe sorprender que se hayan estudiado tanto los fenómenos que intervienen en la hemostasia. El proceso por virtud del cual la sangre líquida se transforma en coágulo sólido ha despertado la curiosidad del hombre, y las consecuencias que en gran número de trastornos tiene el no poder lograr la hemostasia han aumentado el interés por tales estudios. Actualmente es posible disponer de nuevas técnicas para investigar estos problemas, su aplicación ha permitido plantear hipótesis sobre la coagulación de la sangre y una mejor comprensión de muchas de las discrasias sanguíneas que pueden acompañarse de hemorragias, trayendo como consecuencia adelantos terapéuticos (Páramo et al., 2009).

El uso de modelos animales experimentales para imitar condiciones fisiológicas y patológicas humanas ha facilitado el conocimiento de los diferentes procesos involucrados en estas situaciones (Lozier y Nichols, 2013). La rata es un animal muy utilizado en la investigación biomédica debido a su tamaño, fácil mantenimiento, alta tasa de fecundidad, similitud anatomofisiológica con el humano y el amplio conocimiento de su genoma. Existen

modelos murinos para estudiar una diversidad de patologías tales como la diabetes, la aterosclerosis, la sepsis, las enfermedades autoinmunes y la enfermedad de von Willebrand, entre otros. La alteración de los genes en ratas (*knock-out*) ha facilitado estos estudios y ha aumentado enormemente el número de enfermedades que pueden ser investigadas experimentalmente (Hedrich, 2000, Szpirer, 2020). Con el fin de aprovechar al máximo las oportunidades ofrecidas por los modelos animales, es importante que la fisiología básica de las ratas, incluyendo la hemostasia, sea definida o caracterizada.

Las ratas pueden ser modelos animales más adecuados para la experimentación que los ratones en algunas investigaciones, ya que tienen un peso corporal aproximado 10 veces mayor, lo que hace que sea más fácil llevar a cabo mediciones fisiológicas detalladas; así como la manipulación y el muestreo de sangre. Estudios previos han informado valores hematológicos y algunos parámetros hemostáticos en ratas y ratones, enfatizando la importancia de cómo el sexo, la constitución genética, la edad, y las técnicas de extracción de sangre podrían tener un efecto en los resultados obtenidos (Hoover-Plow et al., 2006, Lemini et al., 2007, Rose y Klemcke, 2015).

Por otra parte, entre diversas líneas de ratas utilizadas en investigación se han evidenciado diferencias metabólicas (Kobayashi et al., 2021, Marques et al., 2015), conductuales (Torres-Carrillo et al., 2018) y en la respuesta a la administración de fármacos (Kacew y Festing, 1996, Oltra-Noguera et al., 2015, Taffe et al., 2021). Sin embargo, pocos de estos estudios compara valores de pruebas relacionadas con la hemostasia.

Las líneas de ratas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley, son producidas y suministradas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes. Ambas son líneas no

consanguíneas ampliamente utilizadas en diversas actividades de docencia e investigación, incluyendo estudios para evaluar los efectos de fármacos y productos naturales sobre la hemostasia. Por ello, el objetivo de este estudio es comparar las fases de la hemostasia entre estas dos líneas de ratas, con el fin de aportar información que contribuya a la definición de estas líneas de animales de experimentación en relación con el proceso de hemostasia.

Este trabajo constituye el Trabajo Especial de Grado y se encuentra estructurado de la siguiente manera: el Capítulo I denominado El Problema, está conformado por el planteamiento del problema, la justificación, importancia y objetivos de la investigación. El Capítulo II comprende el Marco Teórico que corresponde a la descripción de los trabajos previos, antecedentes históricos y bases teóricas, seguidamente se presenta el Capítulo III referente al Marco Metodológico, en el que se incluye el tipo y diseño de la investigación, población y muestra, sistema de variables, metodología de la investigación y el diseño de análisis de los resultados. Capítulo IV: Resultados y Discusión, seguidamente el Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones y finalmente se presentan las referencias consultadas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El organismo está regulado por diversos procesos fisiológicos, uno de ellos es la hemostasia. El proceso de hemostasia es considerado un mecanismo de defensa que protege al organismo de las pérdidas sanguíneas que se producen tras una lesión vascular. En la hemostasia interactúan sistemas fisiológicos complejos y precisos que regulan la fluidez de la sangre para mantener un equilibrio entre coagulación y anticoagulación (Sedaño y Flores, 2014).

Clásicamente se ha dividido en hemostasia primaria, en la que participan fundamentalmente las plaquetas a través de los procesos de adhesión, reclutamiento, activación y agregación para formar el tapón hemostático plaquetario inicial, y fase de coagulación sanguínea o hemostasia secundaria, que es la encargada de generar la suficiente cantidad de trombina para que el fibrinógeno se transforme en la fibrina necesaria para formar el trombo. La deficiencia o anomalía del sistema hemostático conlleva una tendencia hemorrágica (ej. hemofilia), mientras que una activación excesiva puede resultar en trombosis que ocluye la luz del vaso, ej. trombosis venosa (Páramo et al., 2009).

Los fenómenos trombóticos tienen diverso origen y constituyen unas de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad. La trombosis arterial y venosa es una consecuencia

común de procesos infecciosos bacterianos y virales, incluyendo la enfermedad infecciosa COVID-19 causada por el coronavirus SARS-CoV-2, pandemia que ha generado la mayor crisis de salud pública en la actualidad (Beristain-Covarrubias et al 2019, Sadoughi et al, 2021). Los trastornos de la hemostasia desencadenados específicamente por la infección por SARS-CoV-2 se han denominado coagulopatía asociada a COVID-19 (Shankar et al. 2021).

La fisiología y fisiopatología de la hemostasia es ampliamente investigada, tanto en humanos como en animales de laboratorio. Los modelos animales representan una herramienta invaluable para estudiar la patogenia de la formación de trombos y evaluar nuevos tratamientos, con este propósito diversos animales de laboratorio son utilizados en la investigación básica y farmacéutica para evaluar los efectos que producen sobre la hemostasia diversos medicamentos, alimentos, fitofármacos y compuestos químicos con potencial farmacológico (Tarandovskiy et al., 2020).

El uso de animales en la investigación es tan antiguo como el propio hombre; sin embargo, en los siglos XVIII y XIX es cuando comenzó a tomar mayor importancia la utilización de animales definidos o estandarizados para la ejecución de los experimentos, con el propósito de obtener resultados reproducibles y confiables; entendiéndose como animal definido o estandarizado aquél del cual se conocen detalladamente las características genéticas y sanitarias (Mrad de Osorio, 2006).

Está establecido que el estudio de los efectos de cualquier fármaco o sustancia sobre el ser humano debe estar precedido de la realización de investigaciones preclínicas con animales de laboratorio, las cuales sirven de base y aportan información útil para el diseño de posteriores investigaciones clínicas. No obstante, la extrapolación de los resultados de los

experimentos realizados en animales hacia el ser humano y otras especies animales, exige la justificación de la investigación, así como la definición detallada de las características anatómicas, fisiológicas y genético-sanitarias del animal. Por ello es importante seleccionar un modelo animal adecuado con patrones fisiológicos y bioquímicos similares al humano, y no muy distantes en la escala evolutiva (Morales, 2015).

Las ratas se han utilizado en muchos estudios experimentales, que han permitido la comprensión de la genética, la fisiopatología de la salud y medicina. Estos animales de laboratorio han demostrado ser valiosos para la investigación, ya que son más tranquilas, pueden tolerar el hacinamiento, producen más descendencia, y sus órganos son de tamaño adecuado para la experimentación. Adicionalmente su anatomía y fisiología es similar a la del humano, lo que permite la extrapolación de los resultados de diferentes estudios (Krinke, 2000).

Aun cuando en la investigación sobre la hemostasia se utilizan diferentes especies de animales de experimentación, las ratas de las líneas Wistar y Sprague Dawley son muy empleadas, debido a que reproducen con alta fidelidad los eventos celulares y moleculares de este proceso (Brooks et al., 2011). Sin embargo, puesto que se han demostrado diferencias en algunos procesos fisiológicos entre líneas de ratas de laboratorio y la selección del ejemplar biológico es relevante para la interpretación y posible extrapolación de los resultados, en la presente investigación se plantea la siguiente interrogante:

¿Existen diferencias en las fases de la hemostasia de ratas de las líneas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley?

Justificación e Importancia de la Investigación

El uso de modelos animales experimentales para imitar condiciones patológicas humanas facilita la comprensión de los procesos involucrados en estas situaciones. Existen modelos animales para estudiar enfermedades como la diabetes, arterioesclerosis, sepsis, enfermedades autoinmunes, entre otras. Los modelos animales también son útiles para investigar la fisiología de la hemostasia, así como para comprender la fisiopatología de los trastornos de este proceso y desarrollar tratamientos, hemostáticos o anti hemostáticos, antes de su aplicación en humanos.

Diferentes especies de animales de experimentación han sido utilizadas en estudios sobre la hemostasia, incluyendo ratas no consanguíneas de las líneas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley. Sin embargo, debido a que variaciones entre las distintas líneas de ratas han sido evidenciadas en modelos animales de patologías cardiovasculares es pertinente conocer la fisiología de la hemostasia en ambas líneas de animales de laboratorio y establecer si entre estas dos líneas de ratas existen diferencias en los valores de referencia de algunas de las pruebas de laboratorio que permiten evaluar el proceso de hemostasia. La información que se generará con esta investigación contribuirá a definir estas dos líneas de ratas, en relación específica con el proceso de hemostasia, y será de utilidad para investigadores y docentes que realizan experimentos en esta área.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Comparar de qué manera se corresponden las fases de la hemostasia, en ratas de Laboratorio de las líneas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley.

Objetivos Específicos

1. Determinar el tiempo de sangría en ratas BIOU: Wistar y ratas BIOU: Sprague Dawley.
2. Determinar la cantidad de plaquetas presentes en ratas BIOU: Wistar y ratas BIOU: Sprague Dawley.
3. Determinar el tiempo de protrombina en ratas BIOU:Wistar y ratas BIOU: Sprague Dawley.
4. Determinar el tiempo parcial de tromboplastina activado en ratas BIOU:Wistar y ratas BIOU: Sprague Dawley.
5. Determinar el tiempo de coagulación en ratas BIOU:Wistar y ratas BIOU: Sprague Dawley.
6. Determinar el porcentaje de fibrinógeno en ratas BIOU:Wistar y ratas BIOU:Sprague Dawley.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El logro de esta investigación está relacionado con la comparación de las fases de la homeostasia en ratas de laboratorio de las líneas BIOU: Wistar BIOU: Sprague Dawley con el fin de aportar información para contribuir a la definición fisiológica de estas líneas de animales de experimentación.

Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones confrontadas durante el desarrollo de la investigación incluyen el elevado costo de los reactivos, así como las fallas en los servicios de electricidad, conectividad a internet, agua y transporte.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

La hemostasia es un tema ampliamente estudiado y que presenta numerosas publicaciones científicas; sin embargo, con relación a las diferencias o semejanzas que existen en las fases de la hemostasia entre líneas de ratas o ratones de laboratorio, y específicamente entre las dos líneas de ratas objeto de estudio del presente trabajo, la información científica disponible es escasa. A continuación se describen en forma resumida algunos de los trabajos relacionados con el objetivo general de esta investigación.

Sudo et al., (2007) realizaron un estudio, en el Instituto de Descubrimiento de Nuevos Fármacos, en Tokushima, Japón, el cual fue titulado: Diferencias genéticas en la agregación plaquetaria y la formación de trombos en ratas de laboratorio. El objetivo de esta investigación fue comparar la agregación plaquetaria y la formación de trombos en ocho líneas de ratas: ACI, Brown Noruega (BN), Donryu, Fischer 344 (F344), ASE, Sprague Dawley, Wistar y WKAH, para ello utilizaron el adenosin-5'-difosfato (ADP) y el péptido activador del receptor de trombina. Este estudio respalda al problema de investigación ya que los autores encontraron diferencias considerables en la agregación de plaquetas, las líneas Sprague Dawley y BN presentaron las respuestas más altas de agregación plaquetaria, mientras que las respuestas más bajas se observaron en las líneas de ratas ACI y F344.

Este mismo grupo de investigadores Sudo et al. (2006), estudiaron el rol fisiológico de genes y proteínas en la activación plaquetaria en el trabajo titulado: Diferencias genéticas entre cepas en la agregación plaquetaria de ratones de laboratorio. Para ello compararon la agregación plaquetaria inducida por colágeno y ADP en 13 cepas de ratones consanguíneos *knockout*: 129/Sv, A, AKR, BALB/c, C3H/He, C57BL/6J, CBA, DBA/1, DBA/2, ddY, FVB, ICR, NZW, y la cepa de ratones diabéticos C57BL/KsJ db/db. Los autores observaron diferencias marcadas en la agregación plaquetaria. La mayor respuesta de agregación con ambos inductores se registró en las cepas AKR/J y NZW/N; mientras que las cepas DBA/2 y DBA/1 presentaron menor agregación plaquetaria. Los investigadores concluyeron que la agregación plaquetaria difiere significativamente entre ratones de laboratorio, y que esta diferencia debería considerarse al utilizarlos en estudios sobre la hemostasia.

Barrios et al. (2009), llevaron a cabo una investigación en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas-Venezuela, titulada: Parámetros hemostáticos en ratones BALB/c, ratones C57BL/6 y C3H/He. Los resultados demostraron que el recuento de plaquetas fue significativamente diferente entre las cepas. Los ratones C57BL / 6 mostraron los valores más altos ($988 \times 103/\mu\text{l}$) y la cepa BALB/c los más bajos ($782 \times 103/\mu\text{l}$). Los niveles de fibrinógeno fueron 2,55 (C57BL/6), 2,37 (BALB/c) y 2.28 g/L (C3H/HeN). En relación con el factor XIII no se observaron diferencias entre las cepas, mientras que los niveles de plasminógeno fueron 142, 80 y 135% en ratones C57BL/6, BALB/c y C3H/He, respectivamente. Según los autores, este es el primer informe con respecto a la hemostasia en diversas cepas de ratones, principalmente sobre el factor XIII y los niveles de plasminógeno. Este trabajo aporta conocimiento útil para el campo de las investigaciones relativas a trastornos hemostáticos usando modelos de ratón.

White et al. (2010) realizaron un estudio en la Clínica Rochester de Estados Unidos en la División de Enfermedades Cardiovasculares, titulado: Diferencias en la hemostasia y trombosis en relación con el inhibidor de la vía del factor tisular en cepas murinas. Los ejemplares biológicos y materiales utilizados fueron ratones machos de tres cepas diferentes: C57BL/6J (C57), 129S1/SvImJ (129S) y Balb/cJ (BalbC), sistema de hematología, analizador de coagulación, solución de citrato de sodio 3,2%, 83,3 mg/ml de ketamina, 16,7 mg/ml de xilacina y solución de FeCl₃. Esta investigación respalda al problema de investigación debido a que los autores concluyeron que existen diferencias significativas entre las cepas en la trombosis y hemostasia, y que la actividad del TFPI (Inhibidor de la vía del factor tisular) circulante se correlaciona con estas diferencias.

Lemini et al. (2007) investigaron, en la Universidad Autónoma de México, la influencia de la especie y el género de ratas y ratones en las pruebas de coagulación. Para realizar el estudio utilizaron ratas Wistar y ratones CD1 machos, hembras sanas y hembras ovariectomizadas. Los parámetros hemostáticos determinados fueron el tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa), tiempo de trombina (TT) y fibrinógeno. Tanto las ratas como los ratones mostraron diferencias intra e inter especies en todos los parámetros analizados. Entre ratas Wistar machos y hembras ovariectomizadas se hallaron diferencias significativas en el TT y el fibrinógeno, la principal diferencia entre ratas machos y ratones machos se obtuvo en el TP. Los resultados indican la importancia de la diferencia de género y de especie en los valores de las pruebas de hemostasia. Los autores sugieren que estas diferencias deben tomarse en consideración al evaluar el efecto de fármacos sobre la coagulación.

Por otra parte, se han publicado estudios relacionados con diferencias metabólicas entre diversas líneas de animales utilizadas en investigación, incluyendo ratas de las líneas Wistar y Sprague Dawley. En este sentido, Miranda et al. (2018) compararon el metabolismo lipídico en el tejido adiposo y hepático de ratas Wistar y Sprague Dawley con obesidad inducida por la dieta. La investigación se realizó en la Universidad de Navarra, España, se utilizaron 16 ratas de la línea Wistar y 16 de la línea Sprague Dawley, cada grupo subdividido en 2 grupos de 8 ratas cada uno, alimentadas durante 6 semanas con dieta calórica normal o dieta rica en calorías, respectivamente. Las ratas Wistar fueron más propensas a acumular tejido adiposo, debido a su mayor lipogénesis y recaptación de ácidos grasos. En contraste, ambas líneas de ratas mostraron similar tejido adiposo hepático después de ingerir la dieta rica en calorías. Los autores concluyeron que las ratas Wistar son de elección en estudios de obesidad inducida por dieta.

www.bdigital.ula.ve

Recientemente, Kisui et al. (2020) publicaron un estudio realizado en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Kanazawa en Japón, cuyo objetivo fue evaluar *in vitro* la influencia de la especie, línea o cepa, y el sexo en la actividad de las hidrolasas (principales enzimas para el metabolismo de fármacos) sobre 24 fármacos. Se utilizaron ratas de las líneas Fischer 344, Sprague Dawley y Wistar, y ratones Balb/c, C3H/He y C57BL/6J; para comparar la actividad de estas enzimas entre los diferentes grupos de animales y los humanos. Los autores encontraron variaciones inter especies en la actividad de las hidrolasas para un mismo fármaco y entre fármacos, por lo que sugieren que esa información debe ser considerada en la investigación preclínica de nuevos fármacos.

Las diferencias en la respuesta de ratas Wistar y Sprague Dawley a la administración de fármacos y tóxicos también ha sido evaluada por autores como Hayakawa et al. (2013) quienes realizaron en Japón una investigación con el propósito de coleccionar datos de estudios de toxicidad de dosis repetidas administradas durante 4, 13 y 26 semanas de cuatro productos farmacéuticos, adicionalmente se evaluó el efecto de restricción de la dieta. Como resultado se obtuvo menor peso corporal y consumo de alimentos en las ratas Wistar Hannover que en las Sprague Dawley. En las ratas Wistar Han el recuento de eritrocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos fue casi el 50% menor en comparación con la línea Sprague Dawley; asimismo, el recuento plaquetario fue 20% menor en ratas Wistar Han. En contraste, se encontraron mínimas diferencias entre ambas líneas en parámetros bioquímicos como las enzimas hepáticas, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. La restricción de la dieta en ratas Sprague Dawley originó valores intermedios para el peso corporal y el consumo de alimentos entre las ratas Sprague Dawley y Wistar Han. De acuerdo con estos resultados, los autores atribuyeron algunas diferencias entre las líneas de ratas al menor consumo de alimentos y el cambio de peso corporal asociado en ratas Wistar Han.

Bases Teóricas

Hemostasia

La hemostasia consiste en la detención de la pérdida de sangre a partir de vasos sanguíneos lesionados. Es un proceso fundamental para la vida, ya que favorece la reparación del tejido endotelial en respuesta a una lesión del vaso sanguíneo; al mismo tiempo, este mecanismo fisiológico es el que asegura el estado líquido de la sangre. La hemostasia permite además que el tapón hemostático no perdure más tiempo del necesario para restablecer la continuidad del vaso.

La magnitud de la respuesta depende del estímulo nocivo y de las condiciones de las células endoteliales que regulan el microambiente en el árbol vascular, lo que en condiciones normales asegura un equilibrio entre la tendencia pro coagulante y la anticoagulante (Montes, 2001).

Ganong. (2006) afirma que es el proceso de formación de coágulos en las paredes de los vasos sanguíneos dañados y la prevención de la pérdida sanguínea, al mismo tiempo que mantiene la sangre en estado líquido dentro del sistema vascular. Hay un conjunto complejo de mecanismos sistémicos interrelacionados que interactúan para mantener este equilibrio entre la coagulación y la anticoagulación. Además, el equilibrio está bajo la influencia de factores locales en diversos órganos.

El mecanismo involucra un cambio de estado físico, de líquido a sólido con la formación de fibrina, y el enlace del coágulo en una malla insoluble (Martínez, 2006).

En humanos y otros animales vertebrados, la respuesta hemostática puede ser conceptualmente dividida en dos fases interdependientes, hemostasia primaria y hemostasia secundaria. La hemostasia primaria involucra componentes celulares divididos en dos grupos: los vasos sanguíneos de las células subendoteliales y las plaquetas. La fase secundaria incluye la acción del sistema de coagulación de la sangre, un sistema que consiste en casi 20 proteínas plasmáticas, la secuencia de las reacciones se debe a estas proteínas plasmáticas descritas colectivamente como la coagulación sanguínea, producen la enzima trombina que al actuar sobre el fibrinógeno lo transforma en la malla de fibrina que refuerza mecánicamente el tapón hemostático (Bhagavan y Ha, 2015).

A continuación se describe en forma más detallada la participación de estos componentes en las fases de la hemostasia.

Fases de la hemostasia

Clásicamente se ha dividido en la hemostasia primaria en la que participan los vasos sanguíneos para contraerse y fundamentalmente las plaquetas para formar el tapón hemostático plaquetario y la hemostasia secundaria que corresponde a la formación del coágulo de fibrina durante el proceso de coagulación sanguínea (Benito et al., 2004, Páramo et al., 2009).

Hemostasia primaria

En condiciones fisiológicas, la hemostasia primaria funciona en forma equilibrada, entre elementos celulares y proteicos, manteniendo la sangre fluida dentro de los vasos. Esto es posible gracias a las funciones de tromborregulación que desempeñan las células endoteliales y las plaquetas, pequeñas células anucleadas, capacitadas para reaccionar ante la lesión de un vaso sanguíneo y formar rápidamente un tapón plaquetario (Martínez, 2006).

El proceso de transformación de las plaquetas inactivas en un tapón plaquetario comprende cuatro etapas: adhesión, agregación, contracción y secreción. Las plaquetas circulan normalmente sin adherirse al endotelio vascular. Al ocurrir una lesión en la pared vascular, las plaquetas se adhieren a los productos sub endoteliales expuestos, como el colágeno y forman un tapón hemostático efectivo. Esta interacción puede ser mediada por el factor de von Willebrand, cuyo receptor plaquetario es el IB-IX. El reclutamiento de otras plaquetas ocurre a través de la interacción plaqueta-plaqueta, mediada principalmente a través del receptor de fibrinógeno (Martínez, 2006).

La contracción de las plaquetas durante y después de la activación plaquetaria produce cambios de su forma discoide a una esfera puntiaguda y exposición de componentes de la membrana cargados negativamente. A continuación se produce la secreción del contenido granular mediada por el ión calcio, convirtiendo grupos de plaquetas libremente asociadas en una masa sólida. Una vez agregadas las plaquetas liberan diversas sustancias, siendo una de las más importantes el factor de activación plaquetaria (Martínez, 2006).

Factor de activación plaquetaria (FAP)

El FAP es un potente mediador químico de la inflamación, es un derivado fosfolípido involucrado en múltiples procesos patológicos relacionados con agregación plaquetaria, reacciones inmunoinflamatorias y trastornos vasculares.

La síntesis del FAP se produce a partir de los ésteres de glicerilo de las membranas. Se ha sugerido que el FAP puede circular de una célula a otra; por ejemplo, ir de las plaquetas a los neutrófilos y servir de precursor en la biosíntesis de FAP en estas células. La síntesis y liberación del FAP se produce en respuesta a diversos estímulos, como factores quimiotácticos, fagocitarios, complejos inmunes, trombina, angiotensina II e interleucinas (Diez, 2001).

Papel del FAP en la formación del trombo

Ante el estímulo del FAP se produce retracción de las células endoteliales y adhesión de plaquetas, cuya morfología se modifica con la emisión de pseudópodos que atraen otras plaquetas hacia la masa en formación; a continuación se produce degranulación de factores plaquetarios y en particular liberación de FAP, que acelera el proceso y atrae otras células. Los neutrófilos afluyen y se mezclan al trombo, también hay invasión de monocitos que fagocitan los desechos de plaquetas y fibrina, y que además liberan radicales libres, leucotrienos y FAP, que atraen a otras células. Alrededor de los eosinófilos se mezcla el trombo en formación al cual se adhieren también eritrocitos y adquiere su forma definitiva (Diez, 2001).

En la Figura 1, se ilustran los elementos que intervienen y el mecanismo de adhesión y agregación plaquetaria. Los receptores plaquetarios, GPIa/IIa y GPIb, se unen al colágeno y

al factor de von Willebrand (vWF) y hacen que las plaquetas se adhieran al plano subendotelial de un vaso sanguíneo lesionado. Los receptores PAR1 y PAR4 reaccionan a la trombina (IIa); y los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ son activados por el ADP; cuando son estimulados, dichos receptores activan la proteína GPIIb/IIIa que se fija a fibrinógeno y la ciclooxigenasa-1 (COX-1) para inducir la agregación y la secreción plaquetarias. El tromboxano A₂ (TxA₂) es el principal producto de la COX-1 que interviene en la activación plaquetaria. La prostaglandina I₂ (prostaciclina, PGI₂) sintetizada por células endoteliales inhibe la activación plaquetaria (Weitz, 2012).

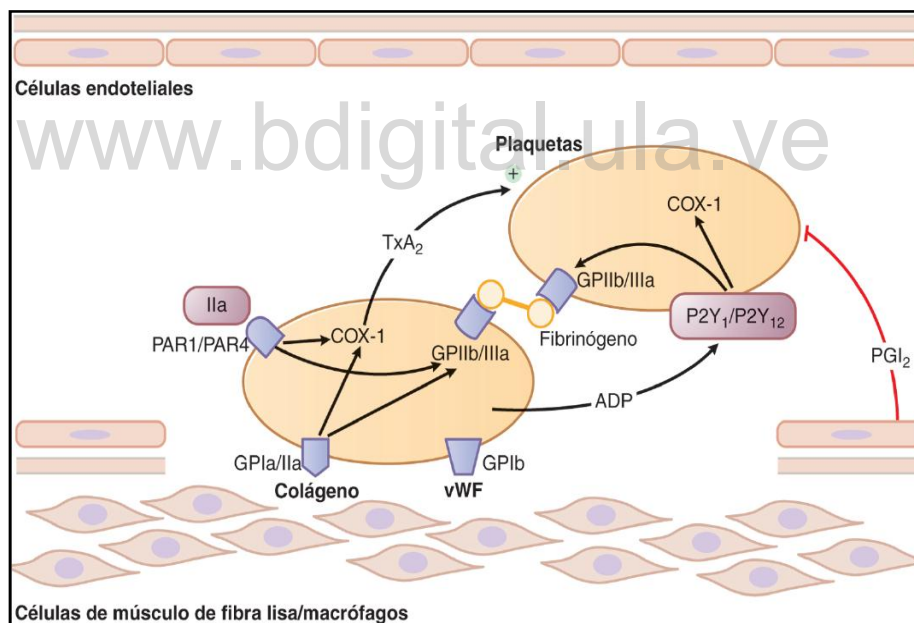


Figura 1. Hemostasia primaria. Activación y agregación plaquetaria. Tomado de Weitz.(2011). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.

En el tapón plaquetario formado en la hemostasia primaria el contenido granular es de alta concentración y cierra la proximidad al área plaquetaria alterada, lo que proporciona la

superficie óptima sobre la cual procede la cascada de la coagulación, en la hemostasia secundaria (Diez, 2001).

Hemostasia secundaria o coagulación

La coagulación de la sangre es un proceso multifactorial y dinámico que se caracteriza por una cascada de reacciones proteolíticas cuya finalidad es convertir el fibrinógeno, proteína soluble del plasma, en fibrina insoluble para formar redes de fibrina capaces de envolver el trombo plaquetario. Este proceso es regulado, a su vez, por un sistema de anticoagulantes naturales; del funcionamiento coordinado de todos sus componentes depende el mantenimiento de la fluidez sanguínea. Su alteración puede ocasionar fenómenos hemorrágicos o trombóticos (Sedaño y Flórez, 2014).

Según Quintana (2002), los modelos de la coagulación *in vivo* se han descrito desde finales de los años 1800, las primeras descripciones estuvieron relacionadas con individuos que desarrollaban trombosis. En 1904 se describió la teoría clásica de la coagulación sanguínea cuando se observó que los tejidos vasculares liberan una tromboplastina tisular, hoy conocida como Factor tisular o Factor III, necesaria para el inicio de la coagulación. En los siguientes años se fueron descubriendo los factores de la coagulación y se les asignó un número romano de acuerdo al orden de su descubrimiento (factor I al XIII), de estos el factor VI no ha sido asignado, el factor IV es conocido como iones de calcio y otros como el cininógeno de alto peso molecular y la precalicreína no se designaron con números romanos.

El modelo más conocido del sistema de coagulación propone dos vías una intrínseca y otra extrínseca, que convergen en la vía común. Este modelo es útil para interpretar los resultados de las pruebas de coagulación que se realizan tanto con fines diagnósticos, como de

seguimiento farmacológico. Permite relacionar los resultados del tiempo de protrombina (TP), el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTa) y el tiempo de trombina, con la actividad de los factores que participan en la vía extrínseca, intrínseca y común, respectivamente (Duarte, 2007).

Diversos autores, entre ellos Silvestre et al. (2006), explica que la vía extrínseca es la más rápida y se activa por la liberación de tromboplastina tisular por los tejidos lesionados activando el factor VII. La vía intrínseca se inicia por la activación del factor XII, que a su vez activa el factor XI, éste el factor IX y el factor VIII. Ambas vías confluyen en la activación del factor X, que inicia una vía común. Ésta lleva a la activación de los factores IV y V, que, junto a los fosfolípidos de las plaquetas, producen la conversión de la protrombina a trombina, induciendo la transformación del fibrinógeno en monómeros de fibrina, que forman un polímero de fibrina con puentes de hidrógeno y estabiliza el coágulo. En la Figura 2 se señalan las interacciones entre proteínas de las vías de coagulación extrínseca (factor hístico y factor VII); intrínseca (factores IX y VIII), y común (factores X, V, II).

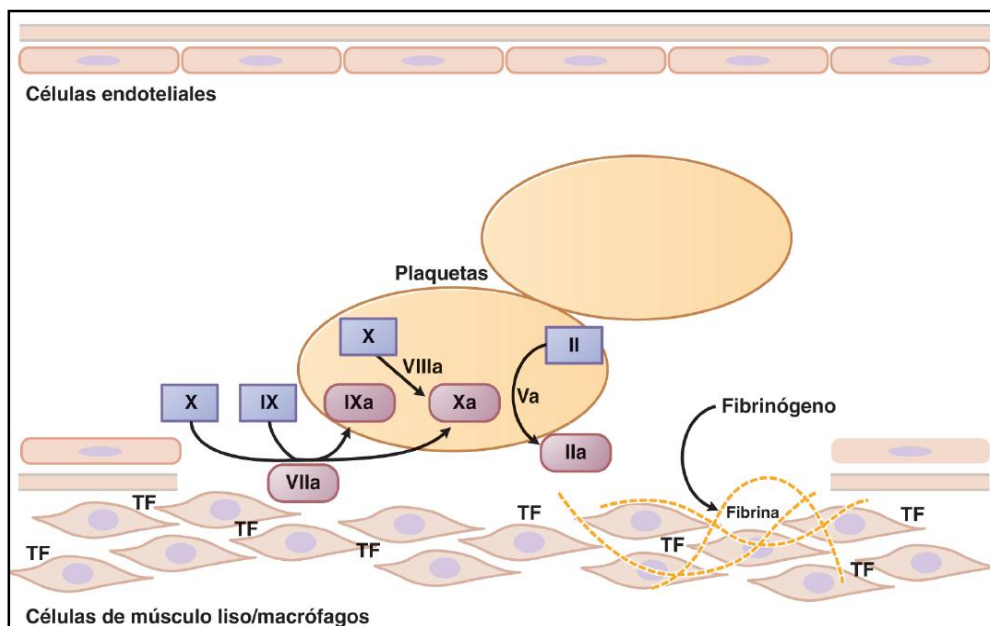


Figura 2. Hemostasia secundaria. Vías de la coagulación sanguínea.
Tomado de Weitz.(2011). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.

www.bdigital.ula.ve

El proceso de hemostasia posee, por parte del endotelio, mecanismos de control que se oponen a la formación del trombo y que influyen tanto sobre las plaquetas como sobre los factores de coagulación. En relación con las plaquetas, el endotelio segrega tres potentes agentes antiplaquetarios: la prostaglandina I₂ (PGI₂) o prostaciclina, el óxido nítrico y ciertos adenosín nucleótidos. En lo que se refiere a los factores de coagulación, por un lado se sintetizan y liberan de la superficie luminal glucosaminoglicanos, como el heparán sulfato y dermatán sulfato, que neutralizan la trombina y el FXa (Weitz, 2012).

La activación de la proteína C es otra vía importante de actividad anticoagulante vascular. Las células endoteliales expresan en su superficie un receptor, la trombomodulina, que al unirse a la trombina, activa la proteína C, ésta unida a la proteína S inhibe la

coagulación por proteólisis del FVa y FVIIIa. Si, a pesar de todos estos mecanismos, se forma fibrina, entra en juego el sistema fibrinolítico a partir del activador tisular del plasminógeno, situado en la pared vascular (Weitz, 2012).

El sistema fibrinolítico disuelve la fibrina intravascular, gracias a la acción de la plasmina. Para iniciar dicho fenómeno, los activadores de plasminógeno en primer lugar convierten el plasminógeno en plasmina. Se conocen dos activadores de plasminógeno: el activador de plasminógeno tisular o hístico (t-PA) y el activador de plasminógeno por urocinasa (u-PA). El sistema fibrinolítico es regulado de manera que se eliminan los trombos de fibrina inútiles, pero se conserva la fibrina en las heridas para mantener la hemostasia. Las células endoteliales liberan t-PA en respuesta a diversos estímulos, incluida la estasis cuando los trombos ocluyen los vasos. El t-PA liberado es eliminado rápidamente de la sangre o es inhibido por el inhibidor-1 del activador de plasminógeno (PAI-1) y en menor extensión por el inhibidor-2 del activador de plasminógeno (PAI-2); adicionalmente, la antiplasmina α_2 (α_2 -AP) inactiva la plasmina. Weitz, (2012). La Figura 3 representa el sistema fibrinolítico.

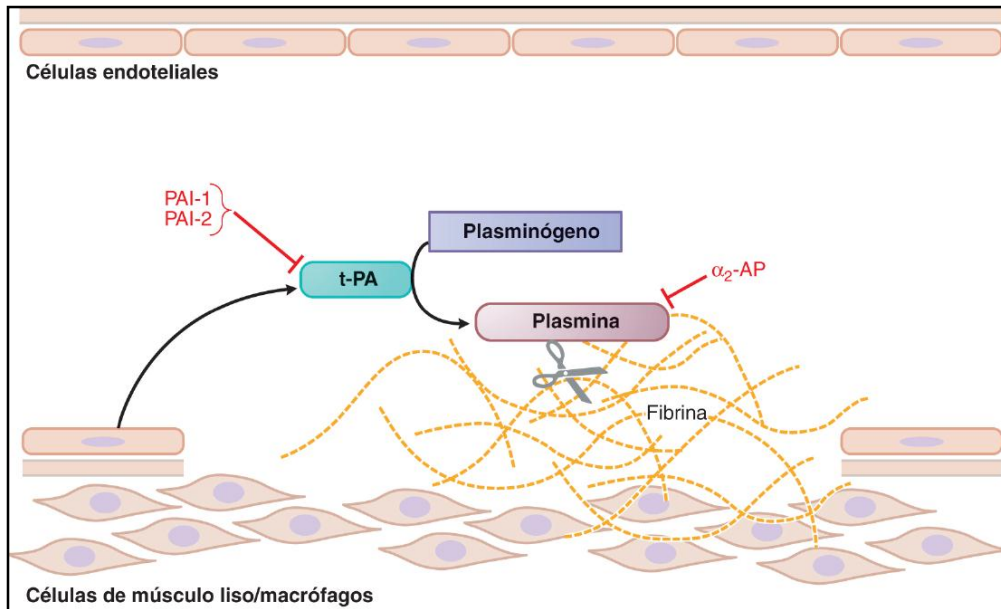


Figura 3. Fibrinólisis. Tomado de Weitz (2011). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.

También existe el modelo celular de la coagulación. Este modelo que reemplaza al modelo tradicional de la cascada de la coagulación propone que la coagulación se lleva a cabo en diferentes superficies celulares en tres fases: iniciación, amplificación y propagación. La primera fase o iniciación ocurre en las células que expresan el factor tisular (FT). En la fase de amplificación las plaquetas y los cofactores son activados para generar mayor cantidad de trombina. La última fase, la de propagación, ocurre sobre la superficie de las plaquetas activadas y se generan grandes cantidades de trombina, para evitar que el equilibrio hemostático se desplace en sentido protrombótico, además de la existencia del sistema fibrinolítico, encargado de degradar los polímeros de fibrina (Quintana y Martínez, 2008).

Factores de la Coagulación

En el proceso de coagulación sanguínea intervienen proteínas plasmáticas, a las que se les asignó un número romano según el orden cronológico de su descubrimiento. La mayoría de estas proteínas o factores de la coagulación, se encuentran inactivos como zimógenos en condiciones fisiológicas y son convertidos a enzimas activas por ruptura de las uniones peptídicas. Sin embargo, algunos factores de la coagulación, como la precalicreína (PK), también llamada Factor Fletcher, y los quinínógenos de alto peso molecular (QAPM), no poseen ningún número, mientras que el factor VI no ha sido asignado, y el factor IV es conocido como iones de calcio (Guerrero y López, 2015). En la Tabla 1 se presentan las funciones de los factores de la coagulación.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 1. Factores de la coagulación. (Modificado de Guerrero y López 2015).

Factor	Función
I Fibrinógeno	Precursor de la fibrina
II Protrombina	Precursor inactivo de la trombina
III Factor tisular	Inicia la vía extrínseca al unirse al FVIIa
IV Calcio	Cofactor enzimático
V Proacelerina (Factor lábil)	Cofactor del complejo protrombinasa
VII Proconvertina (Factor estable)	Inicia junto al factor tisular la vía extrínseca
VIII Factor antihemofílico A	Cofactor del complejo tenasa intrínseco
IX Factor Christmas	En su forma activa es la enzima del complejo tenasa intrínseco
X Factor de Stuart-Prower	En su forma activa es la enzima del complejo protrombinasa.
XI Factor antihemofílico C	En su forma activada es el activador intrínseco del FIX
XII Factor de Hageman,	Iniciador de la vía intrínseca
XIII Factor estabilizante de la fibrina	Transaminasa que entrecruza la fibrina

Trastornos de la hemostasia

Las alteraciones de la hemostasia pueden provocar por defecto hemorragias persistentes y por exceso trombosis. Estos trastornos se clasifican, según la fase que se encuentre afectada, en trastornos de la hemostasia primaria y trastornos de la hemostasia secundaria. Quintero et al. (2004) proponen la clasificación presentada en las Tablas 2 y 3 para los trastornos de la hemostasia.

Tabla 2. Trastornos de la hemostasia primaria.

Púrpuras	Vasculares	Púrpuras	Plaquetarias
Vasculopatías	Vasculopatías	Trastornos	Trastornos
Congénitas	Adquiridas	Cuantitativos	Cualitativos
Telangiectasia hemorrágica hereditaria	Púrpura escorbútica	Producción de plaquetas	Trastornos de adhesión de las plaquetas
Enfermedad de Fabry	Púrpura senil de Bateman	Distribución de plaquetas	Trastornos de agregación
Síndrome de Ehlers-Danlos	Púrpuras por exceso de corticoides	Trombopenias dilucionales	Trastornos adquiridos
Síndrome de Marfán	Púrpuras mecánicas	Destrucción anormal de plaquetas	
Seudoxantoma elástico	Púrpuras idiopáticas	Trombopenias inmunes	

Tabla 3. Trastornos de la hemostasia secundaria.

Alteraciones Congénitas	Alteraciones Adquiridas
Hemofilia A	Trastorno metabólico de la vitamina K
Hemofilia B	Ingesta inadecuada de la vitamina K
Enfermedad de von Willebrand	Coagulación intravascular diseminada Anticoagulantes circulantes

Pruebas de laboratorio para el control de la hemostasia primaria y secundaria

Las pruebas de laboratorio son necesarias para confirmar la gravedad y, sobre todo, la naturaleza de los trastornos hemostáticos. Cada tipo de prueba debe utilizarse según la característica de las hemorragias o patologías de base. Dentro de estas se incluyen pruebas para valorar el defecto vascular y plaquetario (tiempo de sangría, retracción del coágulo, recuento plaquetario y agregación plaquetaria); pruebas que miden la coagulación (tromboplastina parcial activada y tiempo de protrombina); estudio de la formación de fibrina que incluye la determinación del fibrinógeno y el tiempo de trombina (Bernardoni et al., 2004).

Las pruebas de laboratorio útiles para detectar problemas en la hemostasia primaria incluyen los estudios que permiten conocer la cantidad y la calidad de plaquetas como son:

Tiempo de sangría

Consiste en medir el tiempo que dura el sangrado después de hacer una solución de continuidad en la piel; su valor normal es de 3 a 8 minutos. Explora la respuesta plaqueta-endotelio, por lo que refleja la actividad hemostática del tapón plaquetario o un defecto vascular. Si el recuento plaquetario es normal y el tiempo de sangría esta prolongado, el diagnóstico es sugestivo de un trastorno cualitativo de la función plaquetaria o una vasculopatía (Romero y Caraballo, 2011).

El tiempo de sangría se alarga generalmente por la alteración de la pared vascular, trastornos plaquetarios (trombocitopenia cuando las plaquetas descienden por debajo de 100.000mm^3 y en las trombocitopatías), la enfermedad de von Willebrand, disproteinemias, anemias severas y condiciones que produzcan sustancias parecidas a la prostaciclina, como ocurre en la insuficiencia renal crónica. Si se mantiene el diagnóstico de alteración de la función plaquetaria se deben hacer pruebas sofisticadas de adhesión y agregación plaquetaria y evaluar las glicoproteínas de la membrana plaquetaria (Romero y Caraballo, 2011).

Según describe Martinuzzo (2017), el tiempo de sangría se puede medir en humanos por varias técnicas:

Técnica de Duke: Se realiza una incisión con lanceta original de Frank en el lóbulo de la oreja.

Técnica de Ivy: La incisión se realiza en el antebrazo donde se ha colocado un esfigmomanómetro a una presión constante (40 mm de Hg) para llenar los capilares en forma

homogénea y eliminar la variabilidad del tono capilar dependiendo de la tensión arterial del paciente.

Actualmente se utiliza lo que se llama tiempo de cierre; el cual sustituye al tiempo de sangría, es decir es un tiempo de sangría *in vitro*. Para su determinación se utiliza una maquina llamada PFA-100. La prueba consiste en una membrana con un agujero central impregnada de colágeno y adrenalina a través de la cual se hace pasar un flujo de sangre y se mide el tiempo que tarda en cerrarse dicho agujero, reflejando la función plaquetaria (Romero y Caraballo, 2011).

Recuento o contaje plaquetario

Mide la cantidad de plaquetas circulantes. El número de plaquetas debe mantenerse en el intervalo de 150.000 a 400.000/mm³. Evalúa la fase plaquetaria de la hemostasia. Cifras plaquetarias inferiores a 150.000/mm³ indican trombocitopenia, debida al secuestro esplénico, el aumento de la destrucción o utilización, así como su dilución (Ángel, 1993).

El recuento plaquetario en sangre entera refleja, en pacientes normales, el equilibrio que existe entre la producción en médula ósea y las plaquetas en circulación periférica. Martinuzzo. (2017). Si el recuento plaquetario es inferior a 40.000 mm³, puede ocurrir una hemorragia espontánea en reposo, si desciende a menos de 10.000 mm³, la hemorragia puede ser muy grave, particularmente si ocurre en el sistema nervioso central (Romero y Caraballo, 2011).

Los métodos de recuento pueden ser: manuales, semiautomáticos y automáticos. Es conveniente observar al microscopio un frotis de sangre periférica, independientemente del

método de recuento utilizado, donde se evaluará número, distribución, forma y tamaño plaquetario (Martinuzzo, 2017).

Retracción del Coágulo

El tapón hemostático de plaquetas que se forma como resultado de la hemostasia primaria, crece hasta que consigue cerrar la abertura en el vaso. Durante este tiempo, las plaquetas del tapón metabolizan la glucosa y producen ATP de energía este inicia la contracción de una proteína de las plaquetas parecida a la actinmiosina llamada trombostenina que es la causante de la retracción del coagulo. Esta retracción ocurre una vez estabilizado el coagulo, por contracción de las proteínas fibrilares del citoesqueleto plaquetario, de las glicoproteínas receptoras de membrana de la propia fibrina, el coagulo que se retrae queda firmemente adherido a la pared vascular (Alexander, 1951).

Al contraerse el coágulo los hilos de fibrina se contraen gradualmente y expulsan el plasma del coagulo, aunque se retienen eritrocitos, plaquetas y otros elementos sólidos. El plasma expulsado del coagulo tiene poco o nada de fibrinógeno porque se ha convertido en fibrina y se llama suero. Para que ocurra retracción máxima del coagulo, la sangre debe poseer número adecuado de plaquetas.

Al coagularse en forma espontánea la sangre, se forma una masa solida con todos los componentes sanguíneos. Con el tiempo, la acción de las plaquetas sobre la red de fibrina retrae el coagulo reduciendo su masa (Alexander, 1951).

La retracción del coágulo depende del número de plaquetas, de su actividad funcional y de la concentración del fibrinógeno. El grado de retracción se correlaciona muy bien con el

número de plaquetas. Sin embargo, en ciertas condiciones puede resultar normal aún con un número tan bajo de plaquetas como 30 000/mm³. Por alteraciones funcionales como en la tromboastenia de Glanzmann, en ciertas enfermedades sistémicas y en insuficiencia renal aguda o crónica, la retracción del coágulo puede ser incompleta o nula (Zamora-González, 2012).

La prueba debe realizarse en tubos de material plástico o vidrio siliconado, ya que las plaquetas tienden a adherirse y agregarse sobre cualquier superficie que no tenga propiedades antiadherentes similares a las del endotelio normal (Martinuzzo, 2017).

Zamora-González (2012) clasifica el coágulo como retráctil, parcialmente retráctil o irretractil, de acuerdo con su desprendimiento de las paredes del tubo que contiene la muestra de sangre:

Retráctil: El coágulo sanguíneo se desprende totalmente

Parcialmente retráctil: Solo una porción del coágulo se desprende.

Irretractil: El coágulo se mantiene adherido a las paredes del tubo.

En la Figura 4 se esquematizan las pruebas que valoran la actividad plaquetaria.

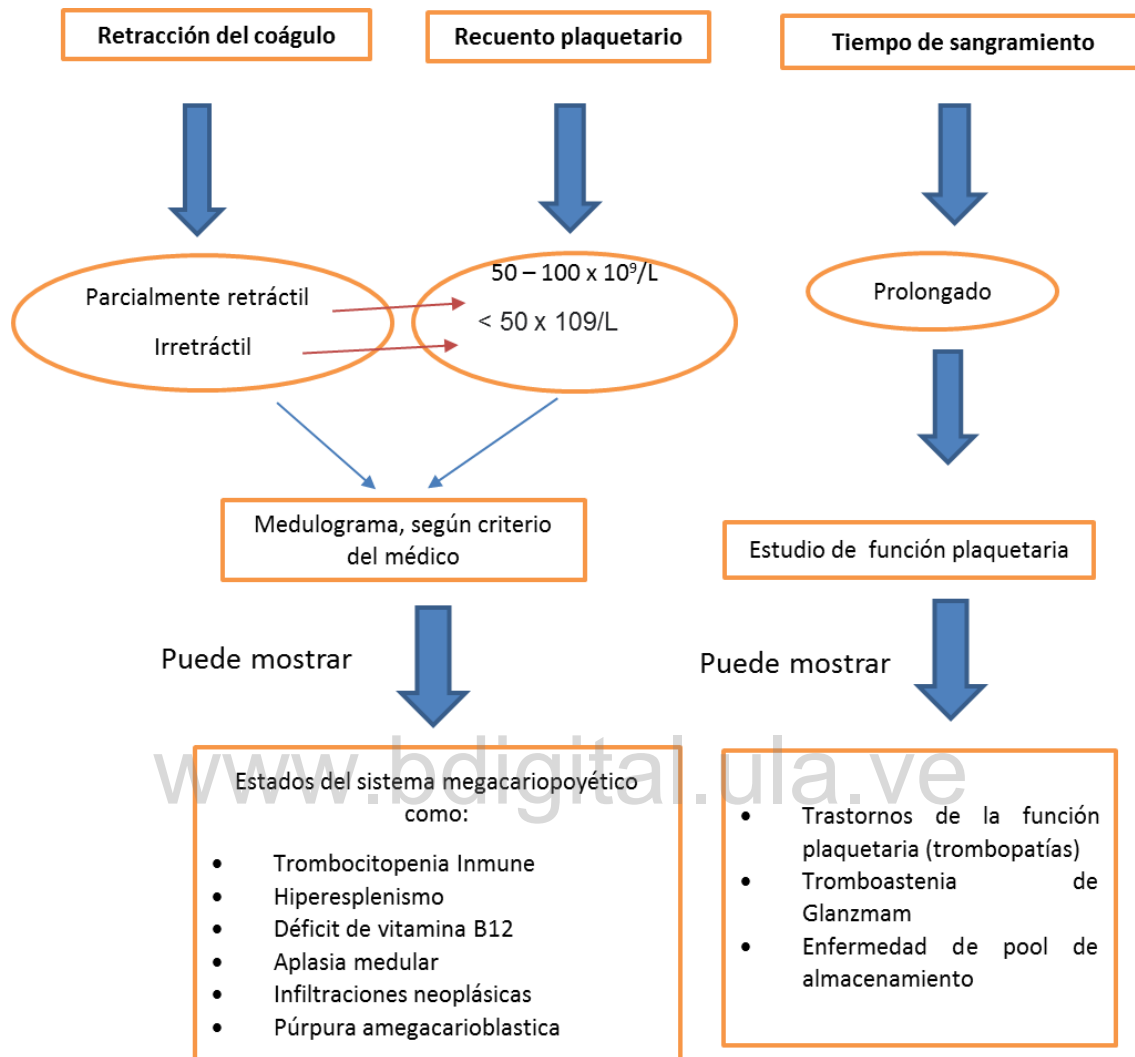


Figura 4. Prueba del coagulograma para la valoración de la actividad plaquetaria en la hemostasia primaria. Tomado-modificado de Zamora-González, 2012.

Con relación a la evaluación de la hemostasia secundaria, las pruebas más utilizadas son las que se describen a continuación:

Tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa)

Mide la actividad de la coagulación en la vía intrínseca. Se denomina Tiempo parcial de tromboplastina activado (TTPa) a la variante de la PTT (tiempo de tromboplastina parcial) que se caracteriza por una mayor sensibilidad y mejor estandarización, cuya dosificación requiere aparatos electrónicos especiales, que informan el momento exacto en que se produce la coagulación entre un reactivo y el plasma, con dato en fracciones de segundo. Es un procedimiento que permite valorar la normalidad o anormalidad de los factores I (fibrinógeno), factor II (protrombina), V, VIII, IX, X, XII. Es la prueba de elección cuando se administran anticoagulantes a base de heparina, reemplazando con altos beneficios al tradicional que se venía empleando del tiempo de coagulación en la terapia anticoagulante. El intervalo normal está entre 25 y 35 segundos (Ángel, 1993).

Para realizar esta prueba se incuba el plasma previamente citratado con cualquier sustancia como caolín, celita o ácido elágico, para activar los factores de contacto. Después de esta activación se añade un sustituto de plaquetas (generalmente un extracto de fosfolípido) y calcio; de esta manera se forma el coágulo (Romero y Caraballo, 2011).

Tiempo de protrombina (TP)

Valora la vía extrínseca, y se puede prolongar por deficiencia de los factores V, VII, X, II, I o fibrinógeno por la presencia anticoagulante tipo warfarina, circulante en el plasma. Cuando existen valores de fibrinógeno inferiores a 100 mg/dl, se puede prolongar el tiempo del TP, que puede formar un coágulo pequeño y fiable. Un caso típico es el de un TP normal

con un fibrinógeno bajo, que ante cualquier exigencia de consumo del factor I afectará esta vía, ocasionando posteriormente sangrado no explicable (Ángel, 1993).

La prueba consiste en agregar al plasma una concentración óptima de tromboplastina tisular (comercialmente disponible), necesaria para activar la vía extrínseca; seguidamente se añade calcio y se mantiene en incubación por un período; luego, se mide el tiempo requerido para la formación del coágulo, que por lo general en humanos es de 12 segundos, aunque se consideran normales valores comprendidos entre 10 y 15 segundos, dependiendo de la actividad de la tromboplastina utilizada (Romero y Caraballo, 2011).

EL TP es útil para investigar alteraciones de la coagulación en diversas enfermedades adquiridas, como las debidas a deficiencia de vitamina K, hepatopatías en la coagulación intravascular diseminada o para el control del tratamiento con anticoagulantes orales tipo warfarina (Ángel, 1993).

Debido a que dependiendo del tipo de tromboplastina que se agregue el resultado puede variar ampliamente, se ha desarrollado un método estandarizado para expresar estas variaciones, la razón internacional normalizada (INR), parámetro que tiene gran utilidad para evaluar la efectividad de la anticoagulación con antagonistas de la vitamina K. (López-Santiago, 2016).

Índice normalizado internacional (INR)

El INR se calcula obteniendo el cociente entre el tiempo en segundos en el que aparece fibrina en una muestra plasmática de un sujeto anticoagulado y el resultado en sujetos normales. Esta relación se corrige utilizando un factor (ISI), que depende de la actividad de la

tromboplastina y que es proporcionado por el fabricante del reactivo, para calcular el índice normalizado internacional. Este rango estima la intensidad de la anticoagulación y permite comparar los resultados de TP en los diferentes laboratorios dentro de ciertos límites. Define el rango terapéutico entre las diferentes indicaciones clínicas, que se encuentran entre 2.0 y 4.5 de anticoagulación (Mendoza, 2008).

Tiempo de coagulación

Tiempo de coagulación de Lee-White

Es uno de los procedimientos de laboratorio de los más antiguos con el que se han tratado de diagnosticar las alteraciones en los mecanismos de coagulación. Consiste en extraer sangre venosa, depositarla en 2 tubos, inclinarlos periódicamente hasta que se produzca la coagulación. Es una prueba poco sensible, que ofrece como utilidad diagnóstica el paso inicial para valorar posteriormente la retracción del coágulo que depende de las plaquetas y de la estructura del coágulo de fibrina. Se utiliza para la evaluación del sistema intrínseco de la coagulación. Los valores de referencia son de 5 a 8 minutos (Ángel, 1993).

El tiempo de coagulación mide la transformación de fibrinógeno en fibrina, se pasa de un estado líquido (fibrinógeno) a sólido (fibrina). Antiguamente se empleaba como método de pesquisa de alteraciones del mecanismo intrínseco de la coagulación y para monitorear la terapia con heparina. Hoy día, su uso en el laboratorio está limitado. Puede estar prolongado en las hemofilias graves, en la afibrinogenemia y en estados fibrinolíticos severos (Navia et al., 2016, Zamora-González, 2012).

Tiempo de coagulación de Milian

Se toman dos láminas de vidrio perfectamente limpias y secas, se coloca en cada una de ellas una gota de sangre.

A los cinco minutos empieza a observarse cada minuto, invirtiendo la lámina con gran cuidado hasta que pueda colocarse verticalmente, sin que se note ninguna deformación en la convexidad de la gota, y se anota este momento. La rapidez de coagulación por este método, es de unos quince minutos para la sangre normal. Si hay distintos tiempos para las dos gotas, se toma la media (Gómez, 1935).

Tiempo de coagulación de Burker

Consiste en colocar tres gotas de sangre en una lámina portaobjetos, disparar el cronómetro. Con ayuda de una aguja cada 15 segundos comprobar que al levantar la muestra hasta que se forme el hilo de fibrina. Detener el cronómetro cuando se forme el hilo de fibrina. Anotar el tiempo transcurrido, el cual corresponde al tiempo de coagulación (Huaman, 2019).

Tiempo de Trombina

El tiempo de trombina evalúa la conversión del fibrinógeno en fibrina, la última etapa de la vía común, que se obtiene agregando trombina bovina al plasma citratado; el valor normal va de 9 a 35 segundos y se prolonga cuando hay fibrinógeno anormal, disminuido o cuando hay elevación de los productos de fragmentación de la fibrina; por lo tanto, resulta un buen parámetro para evaluar coagulación intravascular diseminada y hepatopatías (López-Santiago, 2016).

Fibrinógeno

El fibrinógeno, última proteína de la cascada de la coagulación, puede medirse por métodos químicos o inmunitarios, se encuentra en concentraciones que van de 200 a 400 mg/dL. En condiciones de estrés actúa como un reactante de fase aguda y puede elevarse hasta 800 mg/dL (López-Santiago, 2016).

El nivel de fibrinógeno circulante en plasma se puede determinar por varios métodos, entre estos: el método gravimétrico, el método coagulante de Clauss y el método derivado del Tiempo de Protrombina empleado ampliamente en equipos automatizados, así como por métodos turbidimétricos e inmunológicos (Guerrero y López, 2015).

El método más preciso y utilizado para la valoración del fibrinógeno es el funcional de Clauss, para el cual se induce la coagulación del plasma mediante una concentración elevada de trombina, de modo que el tiempo de coagulación es proporcional a la concentración de fibrinógeno, con escasa interferencia de otros elementos (Guerrero y López, 2015). En la Figura 5 se esquematizan algunas pruebas de laboratorio útiles para evaluar la hemostasia secundaria y las posibles causas de su prolongación.

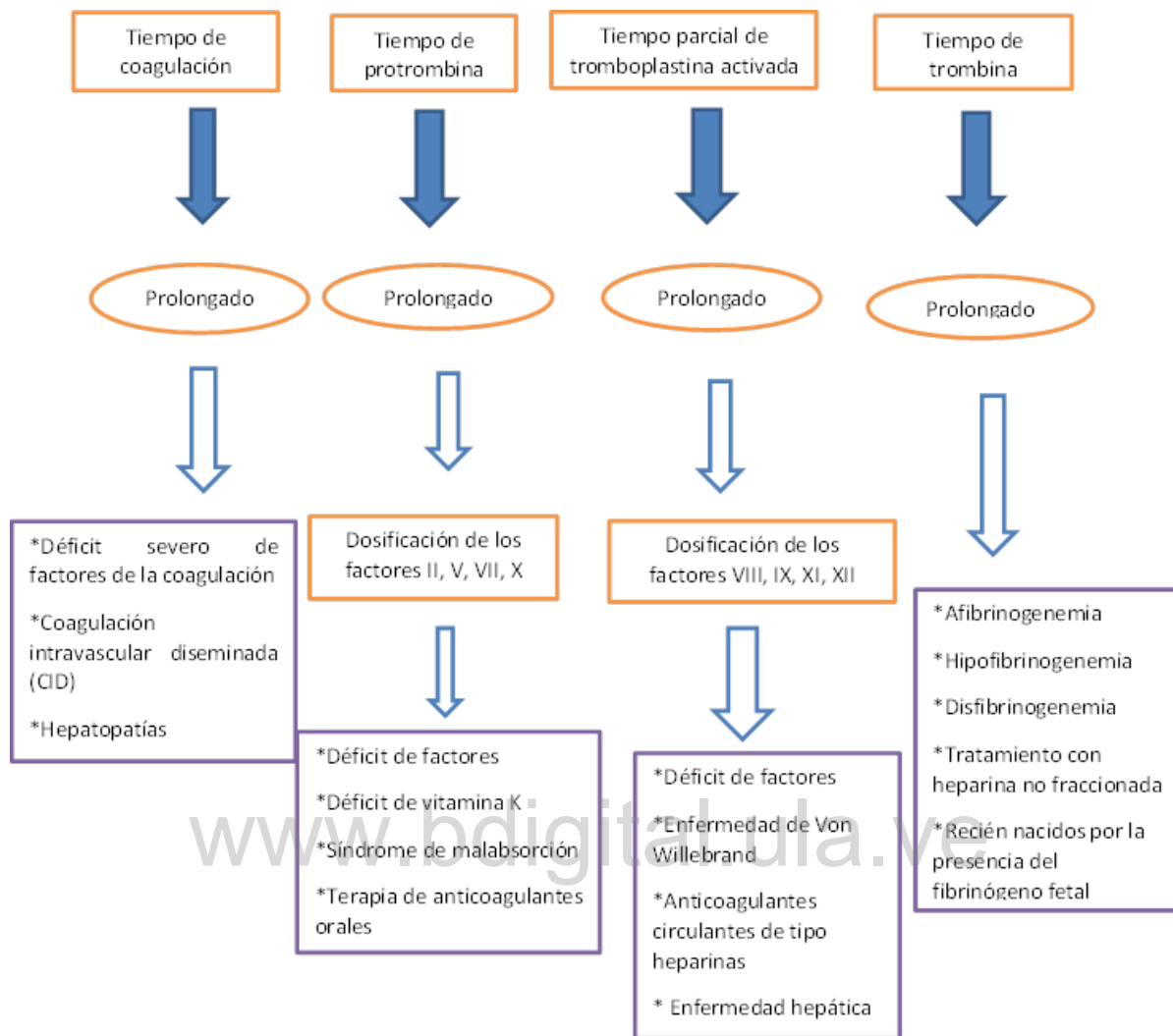


Figura 5. Pruebas del coagulograma modificada para la valoración de la hemostasia secundaria. Tomado-modificado de Zamora-González, 2012.

Ratas de laboratorio

Las ratas de laboratorio son ejemplares biológicos procedentes de la rata noruega salvaje *Rattus norvegicus* (variedad albina) destinadas a la investigación científica. Son consideradas un animal de experimentación modelo y se utilizan en medicina, nutrición, toxicología, neurobiología y otras áreas biomédicas (Salvador et al., 2011).

Se considera que el origen de la rata noruega es el norte de China, desde donde posteriormente se extendió por Europa durante la Edad Media y América del Norte (Foster y Frost, 2018). La aparición de ejemplares albinos y con otros fenotipos de interés condujo a su empleo en los laboratorios. En 1895, la Universidad de Clark (Worcester, Massachusetts, Estados Unidos) creó una población de ratas blancas para estudiar los efectos de la dieta y otros temas de fisiología (Krinke, 2000).

Debido a su velocidad de reproducción, a su facilidad de manejo y a muchas de sus similitudes fisiológicas con el ser humano, la rata ha venido utilizándose desde hace muchos años como sujeto de experimentos en los laboratorios de ciencias biológicas. Con las ratas suelen ponerse a prueba los medicamentos que luego se aplican como tratamiento de las enfermedades humanas; asimismo, se emplean en numerosos experimentos relacionados con la genética, el sueño y muchos otros temas de la salud (Barnett, 2002).

Fundamentalmente, las ratas de laboratorio se diferencian de las silvestres en que son más tranquilas; pueden tolerar grandes multitudes; se reproducen a edades más tempranas y tienen camadas más grandes. Su cerebro, hígado, riñones, glándulas suprarrenales y corazón son más pequeños. No obstante, no existe una única rata de laboratorio, sino que, mediante cruzamientos, se han generado varias líneas (Krinke, 2000). Existen más de 50 cepas no consanguíneas y más de 400 cepas consanguíneas de ratas de laboratorio definidas, siendo las ratas albinas Wistar y Sprague Dawley las más utilizadas (Salvador et al., 2011). Ambas cepas son no consanguíneas, por lo que representan mejor la variabilidad genética de una población y son muy usadas en estudios de toxicología y farmacología (Benavides y Guénet, 2003).

A continuación se describen las características generales de estas dos líneas de ratas de laboratorio, de las cuales proceden las sublíneas utilizadas en la presente investigación, BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley,

Ratas Wistar

Son una cepa no consanguínea de ratas albinas que pertenecen a las especies de *Rattus norvegicus*. Esta variedad fue desarrollada en el Instituto Wistar en 1906 para su uso en la investigación médica y biológica, es la primera cepa de rata desarrollada para servir como organismo modelo en un momento en que los laboratorios utilizaban principalmente ratones caseros comunes. Más de la mitad de todas las cepas de ratas de laboratorio son descendientes de la colonia original de ratas Wistar establecida por el fisiólogo Henry Donaldson, científico administrador (Foster y Frost, 2018).

La cepa de rata Wistar original era una cepa exógena producida y vendida a clientes de todo el mundo por el Instituto Wistar. Los cuatro pares originales fueron llevados de la Universidad de Chicago en 1906, posteriormente se introdujeron varias ratas reproductoras externas en la colonia durante 1918 para impulsar la producción de ratas Wistar. La cepa finalmente se comercializó en 1911. En 1915 Joseph Long obtuvo la rata de laboratorio Long Evans, mediante el apareamiento de las ratas Wistar originales con un macho salvaje de Noruega capturado en Berkeley, CA. Posteriormente, en 1973 una subcepa de la rata Wistar, la Han Wistar, fue establecida a partir de una colonia de ratas Wistar originalmente mantenidas en el Zentral Institute Fur Versuchstierzucht, Hannover, Alemania (Foster y Frost, 2018).

La rata Wistar es actualmente una de las cepas de ratas más populares utilizados en los experimentos de laboratorio. Se caracteriza por su gran cabeza (especialmente en el macho), orejas largas, y tiene una longitud de la cola, que siempre es menor que la longitud del cuerpo. El hocico es agudo, con el labio superior ancho y hendido (Figura 6). Poseen sentido auditivo capaz de captar ultrasonidos, el tacto también alcanza gran desarrollo gracias a las vibrisas. Carecen de vesícula biliar, presentan hígado pentolobulado e intestino largo voluminoso (Hume, 1976).



Figura 6. Rata Wistar. Tomado de Milind y Renu, 2013.

La rata Sprague Dawley y cepas de ratas Long-Evans se desarrollaron a partir de ratas Wistar. Las ratas Wistar son más activas que otras cepas como Sprague Dawley. La rata

Wistar es considerada un animal polivalente desde el punto de vista experimental (Foster y Frost, 2018).

Si bien varias subcepas de la línea Wistar original se han utilizado durante años en estudios de carcinogenicidad, en los últimos 25 años la subcepa Hannover ha sido la más empleada en esta área de investigación, incluso en 1988 se estableció una base de datos constantemente actualizada por el Instituto Fraunhofer de Hannover para hallazgos neoplásicos en esta cepa.

Asimismo, la información de esa base de datos es utilizada por un gran número de empresas del sector farmacéutico, agroquímico e industrias químicas industriales en estudios toxicológicos (Foster y Frost, 2018).

En la Tabla 4 se presentan los valores de referencia de algunos parámetros biológicos de las ratas Wistar (Koolhaas, 2010).

Tabla 4. Parámetros biológicos de ratas Wistar.

Parámetro	Valor de referencia
Número de cromosomas	42
Vida media	2-4 años
Peso al nacer	4.5 – 6 g
Consumo diario de alimento	10g /100g de peso
Consumo diario de bebida	10-15 ml/100g de peso
Frecuencia cardíaca	373-392/min
Presión arterial media	130 mmHg
Volumen sanguíneo	6-7 (% peso corporal)
Temperatura corporal	37,3 °C
Temperatura rectal	37,5 -38,1 °C

Ratas Sprague Dawley

El modelo animal de ratas Sprague Dawley fue desarrollado en 1925 por Robert Dawley. El origen exacto de la cepa no se conoce con exactitud, se cree que el stock original fue derivado por hembras de apareamiento, de ratas hembras Wistar, con un híbrido macho de origen desconocido en la Universidad de Wisconsin y el nombre de la cepa es una combinación del apellido de soltera de su primera esposa (Sprague) y su propio nombre, una empresa comercial que abastecía a las ratas fue posteriormente establecido y conocido como Sprague Dawley Inc. De Madison, Wisconsin, que vendió exclusivamente ratas del mismo nombre (Foster y Frost, 2018).

La descendencia blanca fue endogámica en varias líneas diferentes, de los cuales se combinaron las diez mejores. La selección fue hecha para retener o adquirir características de alta lactancia, rápido crecimiento, buen temperamento y alta resistencia a trióxido de arsénico. En el año 1940, Evan Carl Holzman usando ratas Sprague Dawley de la colonia original creó la rata Holzman. Muchas otras sublíneas de la cepa Sprague Dawley existen y son actualmente las ratas más utilizadas para el desarrollo de productos farmacéuticos en los Estados Unidos y Japón, al igual que las ratas Wistar (Foster y Frost, 2018).

Según Hume (1976) son ratas albinas, de tamaño mediano, dóciles, de fácil manipulación muy prolíferas y susceptibles a afecciones respiratorias. Poseen tres molares únicos a cada lado en ambas arcadas, con un amplio diastema. El hocico es agudo, piloso, con labio superior ancho y hendido, con bigotes largos, las extremidades delanteras con cuatro dedos y el pulgar rudimentario, las posteriores tienen cinco dedos. La cola larga desnuda y escamosa (Figura 5).



Figura 7. Rata Sprague Dawley. Tomado de Taconic Biosciences.

<http://www.taconic.com/pdfs/sprague-dawley-rat.pdf>

Tienen tres pares de mamas inguinales y dos pectorales, carecen de vesícula biliar, el hígado es pentalobulado, encéfalo simple con escasas circunvalaciones, intestino largo y voluminoso, visión desarrollada, sentido auditivo con gran desarrollo capaz de captar ultrasonidos. El peso de las ratas puede variar según el género, el macho por lo general pesa en la edad adulta de 200 – 500 g y la hembra adulta de 250 – 350 g. Tienen un promedio de 260 – 600 pulsaciones por minuto y una frecuencia respiratoria de 100/min. En la Tabla 5 se presentan los valores de referencia de algunos parámetros biológicos de las ratas Sprague Dawley. (Taconic Biosciences.)

Tabla 5. Parámetros biológicos de ratas Sprague Dawley

Parámetro	Valor de referencia
Número de cromosomas	42
Vida media	3 – 4 años
Peso al nacer	5 - 6 g
Consumo diario de alimento	19 (g/día)
Consumo diario de bebida	6 – 10 ml/día
Frecuencia cardíaca	393 lat/min
Presión arterial media	132 (mmHg)
Volumen sanguíneo	5 – 6 (% peso corporal)
Temperatura corporal	37.5 – 38.5 °C
Temperatura rectal	38 °C

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Este capítulo tiene la finalidad de dar a conocer las técnicas de observación utilizadas y los procedimientos de análisis empleados para que sea posible la reproducción de otros investigadores, y no solo para repetirla sino también para verificar la adecuación de dichas técnicas y procedimientos al objeto de estudio, así mismo, se desarrollaron cada una de las pautas que permitieron la presente investigación.

www.bdigital.ula.ve

Tipo de investigación

Según Hurtado (2010) los tipos de investigación están relacionados con los logros esperados durante el proceso de investigación. Específicamente, pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. En tal sentido, esta investigación es de tipo comparativa, ya que se tomó en cuenta el criterio de clasificación en cuanto a las fases de la hemostasia en ratas de laboratorio de las líneas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley.

Diseño de la investigación

El diseño de investigación se refiere a las diferentes estrategias que utiliza el investigador para responder a la pregunta de investigación (Fidias, 2006). Adicionalmente, refiere que el diseño de investigación tiene relación con el dónde y cómo se recopila la información necesaria y la amplitud de la misma, con el fin de responder la interrogante planteada. Al respecto, esta investigación tiene un diseño de campo y de laboratorio, ya que la muestra se recolectó en la realidad y de laboratorio porque fueron procesadas en un escenario creado (Hurtado, 2010).

Población y muestra

Unidad de investigación

La unidad de investigación de este estudio está representada por ratas de laboratorio de las líneas BIOU: Wistar (Figura 8) y BIOU: Sprague Dawley (Figura 9).



Figura 8. Rata BIOU: Wistar.

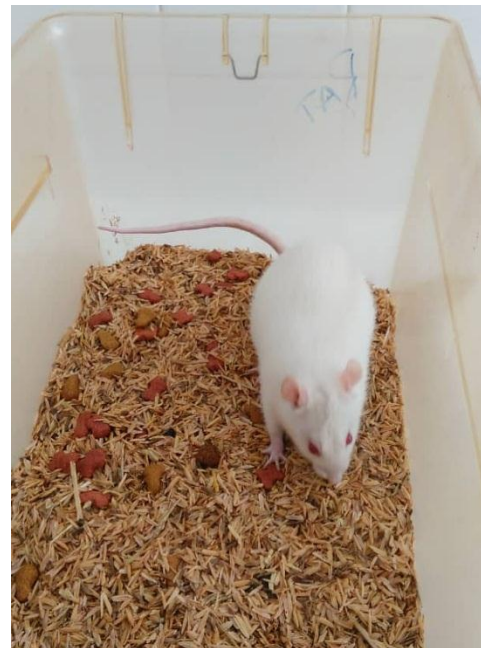


Figura 9. Rata BIOU: Sprague Dawley.

Selección del tamaño de la muestra

Con el propósito de obtener resultados estadísticamente confiables y asegurar la validez de la investigación, se aplicó el método basado en la experiencia de investigaciones previas para establecer el número de animales utilizados en el estudio. En este sentido, el número de ejemplares biológicos incluido (20 ratas, 10 de cada una de las líneas objeto de estudio) es similar al reportado en estudios realizados en animales de las mismas líneas, en los que se han investigado aspectos relacionados con la hemostasia (González y Parra, 2011, Ramírez y Ramnarine, 2012, Sudo et al., 2007).

Sistema de variables

Las variables de una investigación son las características presentes en la unidad de investigación y que se pueden medir; específicamente, se consideran tres categorías: dependiente, independiente e intervinientes.

En esta investigación se consideró como variable independiente a las líneas de ratas de experimentación de sus dos categorías línea BIOU: Wistar y línea BIOU: Sprague Dawley, y la variable dependiente estuvo representada por las pruebas de laboratorio.

Instrumento de recolección de datos

Los instrumentos que se utilizaron para la recolección de datos fueron tablas donde se registraron los resultados de esta investigación.

Procedimiento de la investigación

Se utilizaron 20 ratas, 10 ratas de la línea BIOU:Wistar y 10 ratas de la línea BIOU:Sprague Dawley, de 4 meses de edad, con peso corporal comprendido entre 370 y 400 g, suministradas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), Mérida Venezuela.

Ambas líneas están clasificadas microbiológicamente como animales convencionales limpios y genéticamente como animales no consanguíneos.

El experimento y procesamiento de las muestras se realizó en el BIOULA y en el Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Para proceder a realizar las pruebas de la hemostasia se siguió el siguiente procedimiento:

1. Inducción de la anestesia

Los animales fueron sedados con halotano al 100 % (Figura 10), para luego anestésarlos administrando una dosis de 50 mg/kg de ketamina más xilacina 5 mg/kg por vía intraperitoneal (Figura 11).



Figura 10. Sedación con Halotano al 100%



Figura 11. Anestesia con ketamina más xilacina

2. Pruebas de hemostasia

2.1. *Tiempo de sangría*

El tiempo de sangría se determinó por medio del Método de Duke o método de transección de la cola. El mismo consistió en realizar un corte en la porción distal (a medio

centímetro del extremo) de la cola de la rata con un bisturí de hoja N° 11 (Figura 12). Luego se secó el sitio de la incisión cada 30 segundos, con papel filtro, hasta que la hemorragia se detuvo (Figura 13). El tiempo transcurrido desde el momento del corte hasta el cese del sangramiento se consideró como el tiempo de sangría.

La incisión de la cola de todos los animales del estudio fue realizada por un solo operador previamente calibrado, para asegurar la homogeneidad en la técnica, puesto que diferentes cortes podían alterar los resultados del tiempo de sangría. Asimismo, las pruebas con el papel filtro fueron realizadas por la autora y tutora del estudio, también previamente calibradas.



Figura 12. Corte en la porción distal de la cola de las ratas del estudio.

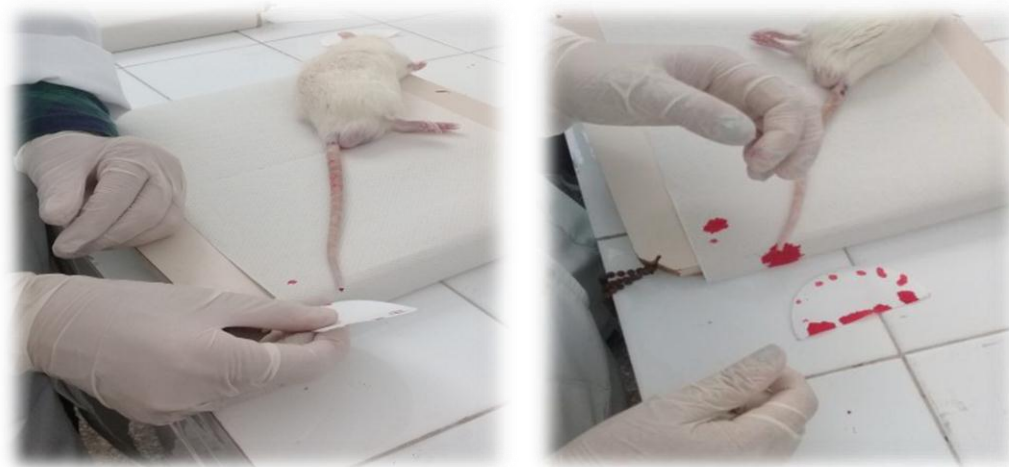


Figura 13. Secado de la cola con papel filtro.

2.2 Contaje plaquetario

Para obtener las muestras de sangre se comprobó que el animal se encontrara anestesiado aplicando un estímulo de dolor (pinchazo en las extremidades posteriores).

La muestra sanguínea fue obtenida del seno retro-orbital, mediante la técnica que a continuación se describe: Una vez anestesiada, la rata fue sujeta estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración. Luego se insertó el capilar en el ángulo externo del ojo (2 mm aprox) y se giró suavemente hasta que la sangre fluyó por el mismo. Se recogió la muestra (2 ml aprox.) en tubos de ensayo y se retiró el capilar. Se oprimió ligeramente la zona de punción con una gasa para detener el sangrado

En un tubo de 75x13 se colocaron 20 μ l de anticoagulante de (EDTA) mas 980 μ l de sangre completa, se mezcló la sangre por 1 minuto y se aspiró con la pipeta de Sahil hasta la marca, se limpió muy bien el exterior de la pipeta y se diluyó esta sangre con Oxalato de Amonio 1% mas 10 μ l de sangre con EDTA, de esta manera se hizo una dilución de la sangre

1:100; se mezcló el contenido del tubo por 2 minutos y utilizando la misma pipeta, se cargaron las dos cámaras del hematímetro (Figura 14), el cual se mantuvo en reposo durante 20 minutos dentro de una cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo se montó el hematímetro en el microscopio se enfocó con el objetivo de 10x en el cuadrado central y luego se pasó al objetivo de 40x y se contaron todas las plaquetas que se observaron en los 25 cuadros (Figura 15).

Cálculos: # de plaquetas/mm³ = nº de plaquetas contadas x FD x FV

FD: factor dilución 2/0,02 = 100

FV: Factor volumen 1/0,1 = 10



Figura 14. Muestra en cámara de Neubauer.



Figura 15. Contaje de plaquetas.

2.3 Tiempo de protrombina (Método de Quick)

En un tubo de ensayo especial de 13 x 100 mm, para la determinación del tiempo de protrombina, se añadió 100 µl de citrato de sodio y 900 µl de sangre, se mezcló y se centrifugó a 2.500 r.p.m durante 10 minutos.

El plasma sobrenadante fue trasvasado a otro tubo de ensayo de 13 x 100 mm utilizando una micro pipeta (Figura 16).

Se colocó el plasma en baño de maría seco 37° C, durante 2 a 3 minutos (Figura 17). En un tubo limpio y seco, se colocaron 100 µl del reactivo y se pre incubaron a 37° C durante 2 a 3 minutos. Se pipetearon 50 µl del plasma pre incubado y se agregaron rápidamente al tubo que contenía los 100 µl de reactivo de tromboplastina cálcica, disparando simultáneamente el cronómetro.

www.bdigital.ula.ve

El tubo se mantuvo dentro del baño de maría y cerca de una fuente de luz, por 5 a 6 segundos, se sacó e inclinó suavemente, y se detuvo el cronómetro en el momento de aparición del coágulo (Figura 18). El tiempo transcurrido fue considerado como tiempo de protrombina.

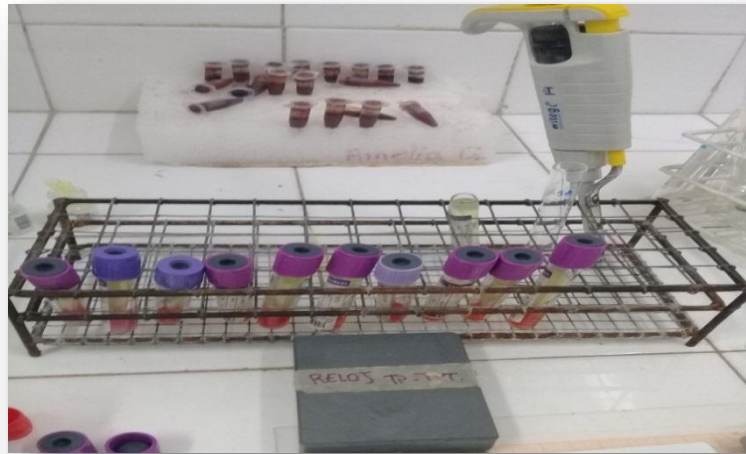


Figura 16. Muestra de suero de los 10 animales.



Figura 17. Baño de María seco a 37°C.



Figura 18. Formación del coágulo. Tiempo de Protrombina.

2.4 Tiempo parcial de tromboplastina activado

En tubos de ensayo, se incubó a 37 °C el Cloruro de Calcio 0.02M y la tromboplastina, durante 3 minutos. Se colocó en un tubo de ensayo 100 µl de la tromboplastina parcial previamente incubada y se dejó incubar durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agregó 100 µl del Cloruro de Calcio 0,02M y se mezcló con el plasma echando a andar el cronometro. En la Figura 19 se muestran los reactivos utilizados para determinar el tiempo parcial de tromboplastina activado. Al observar el coágulo, se detuvo el cronometro y se anotó el tiempo, en segundos, en que esto ocurrió (Figura 20).



Figura 19. Reactivos de Tiempo parcial de tromboplastina activado.

www.bdigital.la.ve



Figura 20. Formación del coágulo.

2.5 Tiempo de coagulación

Se aplicó el método de Burker modificado, descrito en el Manual de Trabajos Prácticos del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, siguiendo el siguiente procedimiento: Se dejó caer una gota de sangre sobre una lámina de vidrio y se anotó la hora. Inmediatamente se colocó la lámina a la altura de la vista y con un alfiler limpio se tocó la gota cada 30 segundos realizando un movimiento circular (Figura 21). Se tomó como tiempo de coagulación el momento en que al tocar la gota se formó un hilo de fibrina.



Figura 21. Determinación del tiempo de coagulación.

2.6 Fibrinógeno

Se recolectó la muestra de sangre de la misma manera que se realizó el procedimiento para determinar el tiempo de protrombina. Se colocó en un tubo 100 μ l de oxalato de sodio 0,1 M y 900 μ l de sangre. Se invirtió el tubo suavemente utilizando papel sellador.

Posteriormente se centrifugó la sangre oxalatada, por 10 minutos a 2.500 r.p.m. En un tubo se colocó 1ml del reactivo de fibrinógeno y 100 μ l del plasma (Figura 22). Se dejó en reposo durante 4 minutos y se leyó inmediatamente a 510nm en el equipo. Los valores de referencia oscilan entre 200 y 400 mg%.

www.bdigital.ula.ve

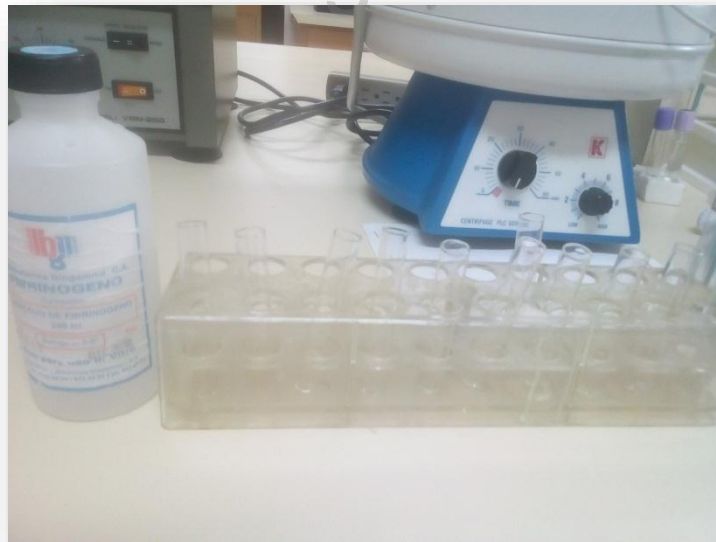


Figura 22. Técnica de determinación del fibrinógeno.

Aspectos bioéticos

Durante el desarrollo de esta investigación se siguieron los fundamentos éticos establecidos por El Código de Ética para la Vida, publicado en el año 2011 por el Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias intermedias de la República Bolivariana de Venezuela (Méndez, 2011); en este sentido se aplicaron los siguientes principios éticos:

- 1 Fue utilizada la cantidad mínima de animales necesarios para obtener resultados estadísticamente válidos.
- 2 Fueron empleadas las técnicas y herramientas experimentales necesarias para minimizar el sufrimiento de los animales.
- 3 Se seleccionaron las líneas de animales apropiadas a los objetivos de la investigación.
- 4 Los animales utilizados en este experimento no fueron utilizados en nuevas investigaciones.
- 5 Los animales fueron tratados como organismos vivos sensibles, durante todo el experimento, evitando o minimizando su incomodidad, sufrimiento y dolor.
- 6 Los autores de la investigación poseían la preparación pertinente para el manejo de animales de laboratorio.

Diseño de análisis

Los datos recolectados durante un proceso de investigación pueden ser analizados a través de dos enfoques: cualitativo y cuantitativo (Hurtado, 2010). En esta investigación los datos se analizaron a través de un enfoque cuantitativo, ya que se registraron numéricamente y fueron analizados a través de estadísticos descriptivos e inferenciales.

Inicialmente se calculó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, para las variables de estudio: tiempo de coagulación (TC), tiempo de sangría (TS), tiempo de protombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa), conteo plaquetario y fibrinógeno, obteniéndose distribuciones normales para las variables TC, TS, plaquetas y fibrinógeno, por ende, en las variables antes señaladas se determinaron pruebas de hipótesis, empleando la prueba paramétrica t de Student de muestras independientes; mientras que a las variables TP y TPT se le aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en función de los objetivos específicos planteados en la investigación, con este propósito se muestran los valores de las pruebas de hemostasia realizadas, siguiendo el orden descrito en el marco metodológico.

La muestra estuvo conformada por veinte ratas de laboratorio (n=20), divididas en dos (2) grupos de investigación el primero corresponde a la línea BIOU: Wistar y el segundo a la línea BIOU: Sprague Dawley.

Tiempo de sangría

En la Tabla 6 se presentan los valores correspondientes a la media aritmética, desviación y error estándar del tiempo de sangría de los dos grupos de estudio.

Tabla 6. Tiempo de sangría (minutos) en ratas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley.

Grupos de investigación	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
BIOU: Wistar	10	12,80	2,098	,663
BIOU: Sprague Dawley	10	8,30	3,335	1,055

Como se evidencia en la tabla anterior, en el grupo de ratas BIOU:Wistar el tiempo de sangría presentó mayor duración que en las ratas BIOU: Sprague Dawley, con diferencia entre ambos promedios de 4,5 minutos, la cual fue estadísticamente significativa al aplicar la prueba t de student para muestras independientes, a un nivel de confianza del 95%, obteniendo el valor $p = 0,002$.

En el Gráfico 1 se presentan las medias y errores estándar del tiempo de sangría obtenido en cada grupo de estudio.

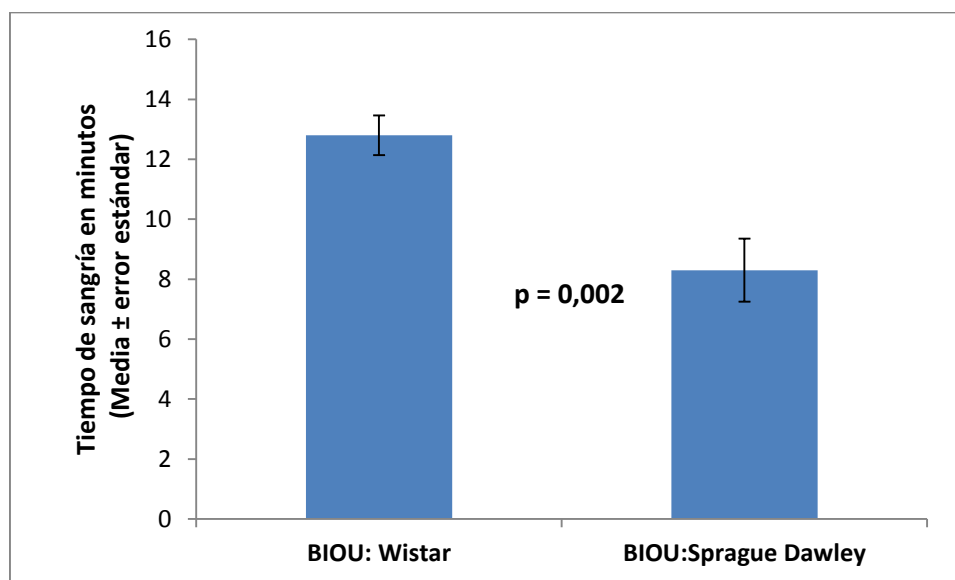


Gráfico 1. Tiempo de sangría (minutos) en ratas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley.

Contaje plaquetario

Los valores correspondientes a la media aritmética, desviación estándar y error estándar del número de plaquetas obtenido en cada grupo de estudio se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Número de plaquetas en ratas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley.

Grupos de investigación	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
BIOU: Wistar	10	329500,00	99.483,388	31459,409
BIOU: Sprague Dawley	10	322000,00	71.460,945	22597,935

Como se observa Gráfico 2, los promedios del contaje plaquetario de ambas líneas de ratas incluidas en este estudio son semejantes, sin hallar diferencia estadísticamente significativa al aplicar la prueba estadística t de student para muestras independientes ($p = 0,849$).

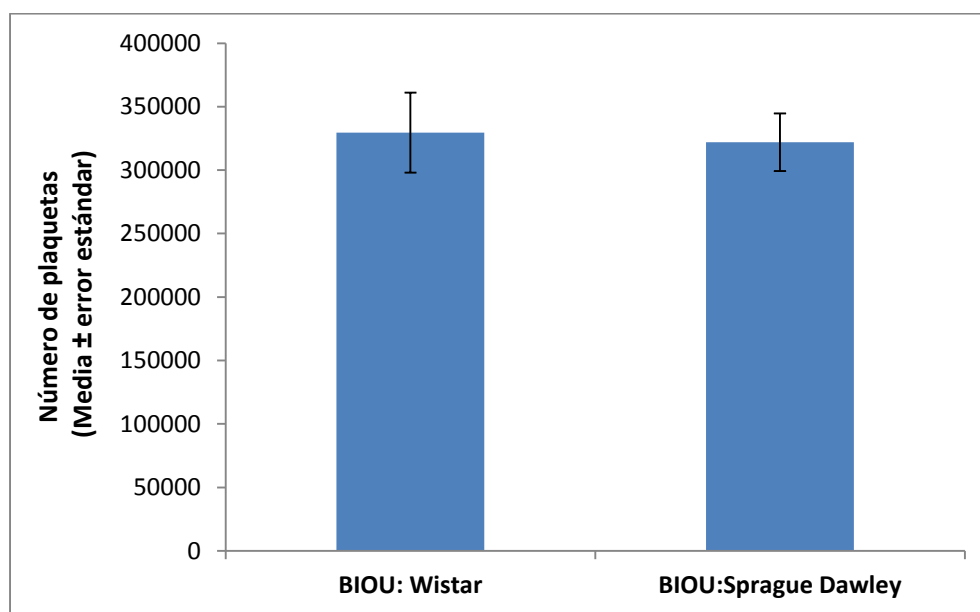


Gráfico 2. Contaje plaquetario en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley.

Tiempo de protrombina

La media, desviación estándar y error estándar correspondiente al tiempo de protrombina (segundos) obtenido en los grupos de ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley se presentan a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8. Tiempo de protrombina (segundos) en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley.

Grupos de investigación	N	Rango promedio	Suma de rangos	Media	Desviación estándar	Error estándar
BIOU: Wistar	10	13,75	137,50	13,50	0,850	0,269
BIOU: Sprague Dawley	10	7,25	72,50	12,30	0,823	0,260

La prueba de hipótesis para los rangos promedios de los tiempos de protrombina mediante la prueba estadística U de Mann-Whitney determinó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio a un nivel de confianza del 95%, con un valor $p=0,011$.

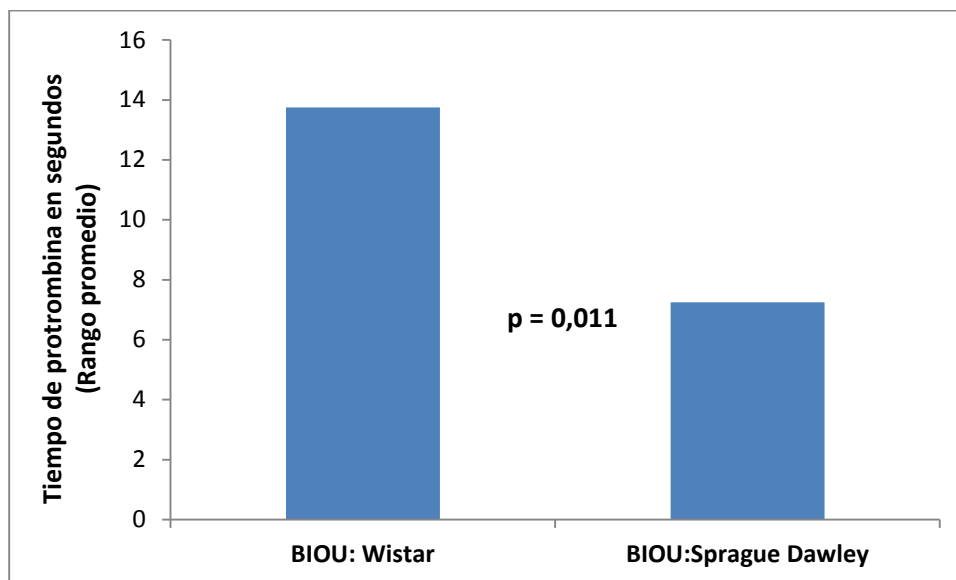


Gráfico 3. Tiempo de protrombina en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley .

Tiempo parcial de tromboplastina activado

En la Tabla 9 se presentan los rangos promedio, suma de rangos, media aritmética, desviación y error estándar correspondientes al tiempo parcial de tromboplastina activado hallado en ambos grupos de estudio.

Tabla 9. Tiempo parcial de tromboplastina activado (segundos) en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley .

Grupos de investigación	N	Rango promedio	Suma de rangos	Media	Desviación estándar	Error estándar
BIOU: Wistar	10	12,85	128,50	45,30	11,963	3,783
BIOU: Sprague Dawley	10	8,15	81,50	35,40	2,914	,921

Como se observa en la tabla anterior y en el Gráfico 4, la media aritmética y rango promedio del tiempo parcial de tromboplastina activado del grupo de ratas BIOU:Wistar son mayores que los del grupo de ratas BIOU:Sprague Dawley. Sin embargo, al aplicar la prueba estadística U de Mann-Whitney, la diferencia entre los rangos no es estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95% ($p = 0,075$).

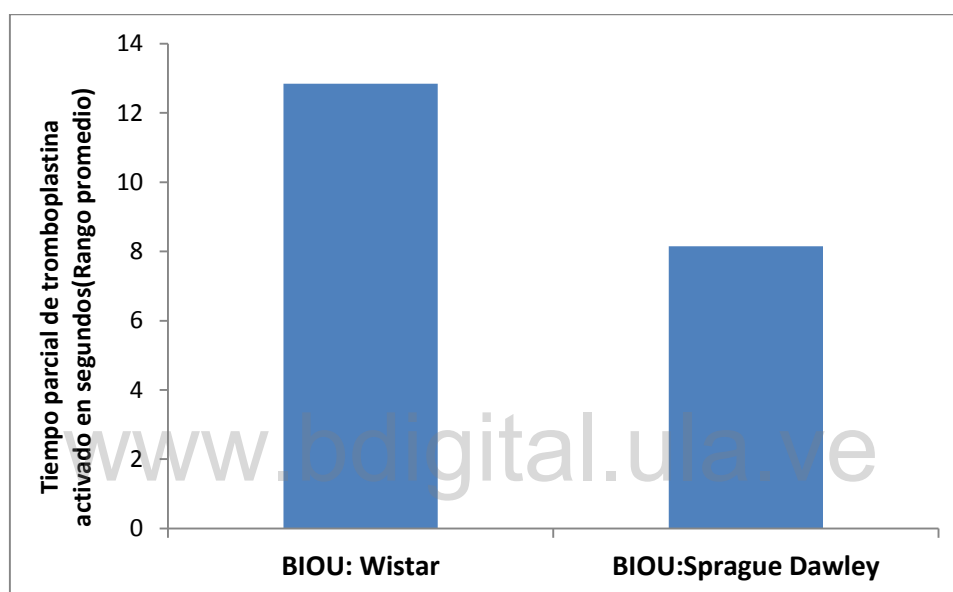


Gráfico 4. Tiempo parcial de tromboplastina activado en ratas BIOU:Wistar y BIOU: Sprague Dawley

Tiempo de coagulación

Los valores correspondientes a la media aritmética, desviación estándar y error estándar del tiempo de coagulación obtenido en cada grupo de estudio se presentan la Tabla 10.

Tabla 10. Tiempo de coagulación en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley.

Grupos de investigación	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
BIOU: Wistar	10	2,3000	0,97753	0,30912
BIOU: Sprague Dawley	10	2,3750	1,43976	0,45529

En el Gráfico 5 se muestran las medias aritméticas y errores estándar del tiempo de coagulación correspondientes a los grupos de ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley incluidos en este estudio. Como se observa, los tiempos de coagulación de ambos grupos son similares, sin hallar diferencia estadísticamente significativa al realizar el contraste de hipótesis mediante la prueba estadística t de student a un nivel de confianza del 95% ($p=0,893$).

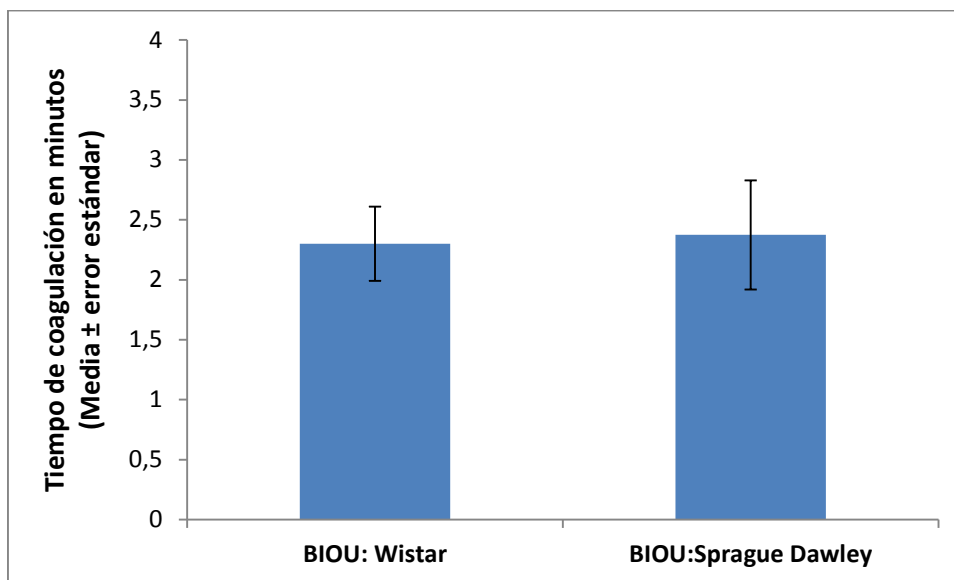


Gráfico 5. Tiempo de coagulación en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley.

Fibrinógeno

www.bdigital.ula.ve

En la Tabla 11 se indican los datos correspondientes a la media aritmética, desviación estándar y error estándar del tiempo de coagulación obtenido en los dos grupos de estudio.

Tabla 11. Fibrinógeno (%) en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley.

Grupos de investigación	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
BIOU: Wistar	10	500,10	187,874	59,411
BIOU: Sprague Dawley	10	538,90	184,250	58,265

La comparación de las medias aritméticas del valor porcentual del fibrinógeno hallado en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley se representa en el Gráfico 6. Como se observa, existe semejanza en los resultados obtenidos en ambos grupos de ratas, por lo que al aplicar la prueba estadística t de student para muestras independientes a un nivel de confianza del 95% la diferencia entre las medias no fue estadísticamente significativa ($p= 0,647$).

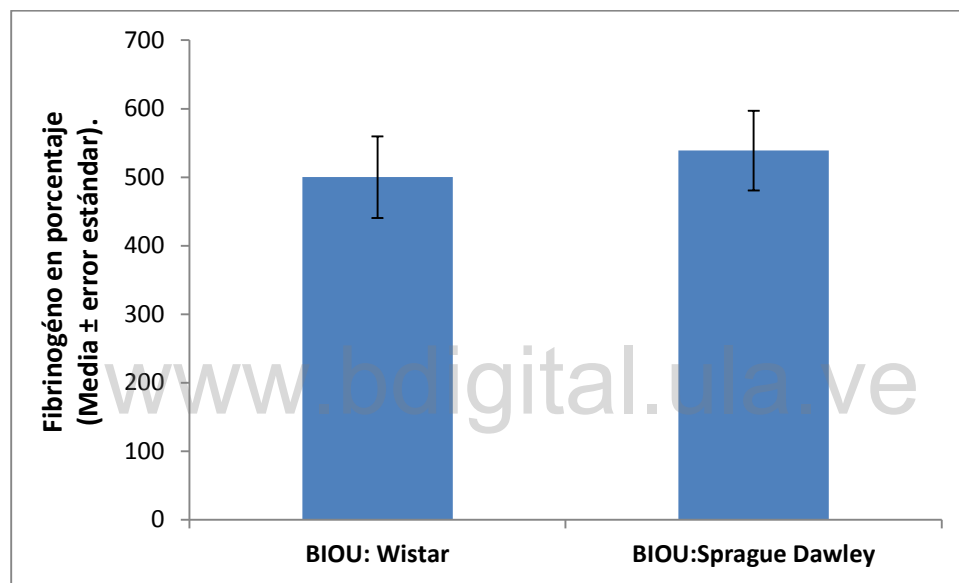


Gráfico 6. Fibrinógeno (%) en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley.

DISCUSIÓN

La hemostasia es el proceso fisiológico que detiene el sangrado ante una lesión vascular y clásicamente se ha dividido en dos fases, la hemostasia primaria en la que participan los vasos sanguíneos para contraerse y fundamentalmente las plaquetas para formar el tapón hemostático plaquetario y la hemostasia secundaria, que corresponde a la formación del coágulo de fibrina durante el proceso de coagulación sanguínea (Páramo et al., 2009).

Las ratas de laboratorio, incluyendo las líneas Wistar y Sprague Dawley, son ampliamente usadas como modelos animales para estudiar las fases de la hemostasia; sin embargo, debido a que se han demostrado diferencias en algunos procesos fisiológicos entre líneas y sublíneas de estos animales, es necesario conocer su perfil hemostático a fin de seleccionar la más adecuada a los objetivos de una determinada investigación. Con este propósito en el presente estudio se compararon las fases de la hemostasia en ratas de laboratorio BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley, ambas líneas producidas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes.

Para evaluar la hemostasia primaria se determinó en animales de ambas líneas el tiempo de sangría y el recuento plaquetario. El tiempo de sangría es una prueba ampliamente usada en la investigación de la hemostasia en ratas y ratones (Kopić et al., 2019) sencilla, de bajo costo y con poco impacto en la salud del animal (Mohammed et al. 2020). Los resultados demostraron que el tiempo de sangría fue significativamente menor en las ratas BIOU:Sprague Dawley ($p=0,002$). La diferencia hallada en los tiempos de sangría en esta investigación

coincide con los reportes de otros autores, quienes encontraron variación en el tiempo de sangría al comparar distintas líneas de ratas y ratones de laboratorio.

En relación con los estudios en ratas, Sudo et al. (2007) evaluaron diferencias en la formación de trombos inducidos con cloruro férrico y en el tiempo de sangría de ocho líneas de ratas que incluían Wistar y Sprague Dawley, y hallaron mayor formación de trombos, así como menor tiempo de sangría en las ratas Sprague Dawley que en las ratas Wistar, ACI, Brown Noruega (BN), Donryu, Fischer 344 (F344), ASE y WKAH. En estudio realizado en otras líneas de ratas, Cooley et al. (2005) demostraron mayor formación de trombos arteriales y venosos inducidos por anastomosis en ratas Copenhagen que en la línea Lewis, y menor tiempo de sangría, aunque para esta última variable la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Asimismo, se han evidenciado diferencias en el tiempo de sangría entre distintas líneas de ratones de laboratorio. Por ejemplo, Hoover-Plow et al. (2006) compararon el tiempo de oclusión arterial, el tiempo de sangrado y el tiempo de resangrado en el modelo de trombosis inducida en la arteria carótida con cloruro férrico y reportaron mayor tiempo de oclusión del trombo y menor tiempo de resangrado en ratones C57BL / 6J que en ratones A/J, aunque el tiempo de sangrado fue similar en las dos cepas. Posteriormente, White et al. (2010) utilizando este mismo modelo de trombosis arterial obtuvieron menor tiempo de sangría y mayor tendencia a la formación de trombos arteriales en la cepa de ratones Balb/cJ (BalbC), al compararla con las cepas C57BL/6J (C57) y 129S1/SvImJ (129S).

Aun cuando el tiempo de sangría fue significativamente menor en la línea BIOU:Sprague Dawley, el recuento plaquetario de ambas líneas de estudio fue similar. En

contraste, Hayakawa et al. (2013) reportaron en ratas Sprague Dawley un recuento plaquetario 20% mayor que en las Wistar Han. Asimismo, en ratones de laboratorio Barrios et al. (2009) demostraron diferencias significativas en el recuento plaquetario entre ratones de las cepas C57BL / 6, BALB/c y C3H/HeN, los ratones C57BL / 6 mostraron los valores más altos y la cepa BALB/c los más bajos.

La semejanza hallada en el recuento plaquetario en la presente investigación sugiere que la diferencia obtenida en el tiempo de sangría no está relacionada con variación en el número de plaquetas de las ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley. Puesto que el tiempo de sangría es fundamentalmente una medida de la integridad de los componentes vascular y plaquetario de la hemostasia primaria (Martinuzzo, 2017), es posible que existan diferencias entre estas líneas de ratas en la función vascular y/o en la adhesión, agregación y activación de las plaquetas o función plaquetaria.

Autores como Sudo et al. (2007) demostraron diferencias en la agregación plaquetaria inducida por colágeno, ADP y el péptido activador del receptor de trombina (TRAP) entre las ocho cepas de ratas incluidas en su estudio, de éstas las ratas Sprague Dawley y las BN presentaron alta agregación plaquetaria, mientras que las cepas F344 y ACI tuvieron baja respuesta a los inductores de la agregación plaquetaria; adicionalmente, estos investigadores asociaron la alta agregación plaquetaria de las ratas Sprague Dawley con la formación de trombos y el menor tiempo de sangría registrado en esta línea, por lo que sugieren que diferencias entre líneas de ratas de laboratorio en la agregación plaquetaria, tienen efecto en la formación de trombos y el tiempo de sangría.

Aun cuando la agregación plaquetaria está mediada fundamentalmente por la interacción plaqueta-plaqueta, también las interacciones plaqueta-leucocito y plaqueta-eritrocito, así como los mediadores químicos liberados por estas células, intervienen en la agregación plaquetaria (Sudo et al., 2006). En consecuencia, es posible que diferencias en la cantidad de eritrocitos y/o leucocitos entre líneas de ratas de laboratorio puedan contribuir a variaciones en la agregación plaquetaria y por consiguiente en el tiempo de sangría. Como dato interesante, Hayakawa et al. (2013) reportaron mayor recuento de eritrocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos en ratas Sprague Dawley que en ratas Wistar Han; con base en esta información podría plantearse que en las ratas BIOU:Sprague Dawley el tiempo de sangría fue menor debido a una mayor agregación plaquetaria y participación de los eritrocitos y leucocitos; sin embargo, estos elementos celulares no fueron determinados en la presente investigación, por lo que para confirmar esta teoría se requieren estudios adicionales.

La evaluación de la hemostasia secundaria estuvo representada por la determinación del TP, TPTa, tiempo de coagulación y del fibrinógeno. En concordancia con el resultado obtenido para el tiempo de sangría, el TP fue significativamente menor en el grupo de ratas de la línea BIOU: Sprague Dawley ($p=0,011$). Este resultado es opuesto al reportado por Urushidani et al. (1978), quienes hallaron mayor TP en ratas Sprague Dawley que en ratas Wistar. Sin embargo, en ese estudio las ratas fueron tratadas con aspirina para inducir úlceras gástricas, la diferencia entre las cepas fue atribuida a mayor sensibilidad de las ratas Sprague Dawley al efecto de fármacos que actúan sobre la hemostasia. Por el contrario, Cooley et al. (2005) no hallaron diferencia en el TP entre ratas Copenhagen y ratas Lewis PT, aunque en las

ratas Copenhagen hubo mayor formación de trombos, por lo que los autores atribuyeron el estado protrombótico de esta línea a la hiperreactividad plaquetaria.

Resultados contradictorios también han sido publicados en estudios comparativos entre cepas de ratones de laboratorio. En este sentido, White et al. (2010) no hallaron diferencia en el TP entre ratones Balb/cJ (BalbC) C57BL/6J (C57) y 129S1/SvImJ (129S), aunque en la cepa Balb/cJ se registraron más trombos. Asimismo, Ohkura et al. (2007) investigaron variaciones circadianas en la coagulación y fibrinólisis en ratones de las cepas Jcl:ICR, C3H/HeN, BALB/cA, y C57BL/6J sin hallar diferencias entre las cepas con relación al TP; resultados similares publicaron Donat et al. (2020) en ratones transgénicos WT y C1q. Sin embargo, Kopic' et al. (2019) analizaron parámetros de la coagulación en nueve subcepas de ratones transgénicos de las cepas 129S1/Sv, BALB/c y C57BL/6, y hallaron mayor TP en la subcepas AnCrl, J y OlaHsd de ratones BALB/c.

El TP evalúa la vía extrínseca de la coagulación sanguínea y permite valorar en forma global los factores II, V, VII, X y el fibrinógeno o factor I (Pichler, 2008), es un indicador de la activación del factor VII por el factor tisular (Hoover-Plow et al., 2006). En consecuencia la diferencia observada en el TP entre ratas BIOU:Sprague Dawley y BIOU:Wistar sugiere que existe variación en la actividad de uno o varios de estos factores, entre estas dos líneas de animales. Por tanto, la medición, en futuras investigaciones, de la concentración y actividad de los factores que participan en esta vía podría contribuir a explicar el resultado obtenido.

Aun cuando en la presente investigación el TPTa fue menor en el grupo de ratas de la línea BIOU:Sprague Dawley, estadísticamente la diferencia entre los promedios de ambos grupos de estudio no fue significativa ($p = 0,075$). Cooley et al. (2005) tampoco hallaron

diferencia en el TPTa entre ratas Copenhagen y ratas Lewis. Asimismo, entre las cepas de ratones de laboratorio Jcl:ICR, C3H/HeN, BALB/cA, y C57BL/6J no se demostró diferencia significativa en el TPTa (Ohkura et al., 2007). Igualmente las cepas de ratones Balb/cJ (BalbC) C57BL/6J (C57) y 129S1/SvImJ (129S) presentaron un TPTa similar (White et al., 2010). Por el contrario, entre las cepas de ratones transgénicos WT y C1q si hubo variación significativa en el TPTa, indicando un incremento de la coagulación en la cepa C1q (Donat et al., 2020).

El TPTa evalúa la vía intrínseca de la coagulación, y conjuntamente con el TP también valora la vía común (López-Santiago, 2016). Es una prueba de detección global para los factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II y el fibrinógeno de la vía común (Pichler, 2008). Debido a su mayor confiabilidad el TPTa ha reemplazado al tiempo de coagulación de sangre completa (Ruiz-Bedolla et al., 2007). En concordancia, en este estudio tampoco se encontró diferencia significativa entre los tiempos de coagulación de las ratas BIOU:Sprague Dawley y BIOU:Wistar. Los resultados obtenidos con ambas pruebas en la presente investigación sugieren que entre las líneas BIOU:Sprague Dawley y BIOU:Wistar no existe diferencia en la vía intrínseca y en la vía común de la coagulación.

En relación con el fibrinógeno, las dos líneas de ratas objeto de estudio de esta investigación presentaron valores similares; la discusión del resultado obtenido para esta variable con lo reportado en estudios previos está limitada, puesto que en la literatura consultada no se hallaron trabajos en los que se halla comparado el nivel de fibrinógeno entre líneas de ratas de laboratorio. No obstante, en ratones Barrios et al. (2009), tampoco encontraron diferencias significativas en los niveles de fibrinógeno de las cepas C57BL / 6,

BALB/c y C3H/HeN; mientras que Hoover-Plow et al. (2006) demostraron que ratones de la cepa A/J poseen mayor cantidad de fibrinógeno que los ratones C57BL / 6J.

Los resultados de este estudio evidencian diferencias entre las ratas de laboratorio BIOU:Sprague Dawley y BIOU:Wistar, tanto en la hemostasia primaria como en la hemostasia secundaria; específicamente el tiempo de sangría y el TP fueron significativamente menores en las ratas BIOU:Sprage Dawley. Las bases genéticas de cada línea de ratas pudieran ser la causa de diferencias en la función plaquetaria o en la expresión y/o actividad de los factores de coagulación, proteínas anticoagulantes y componentes del sistema fibrinolítico.

Estas diferencias pueden interferir con la interpretación de los resultados de investigaciones que incluyan animales de estas líneas, por lo que la selección apropiada de una línea u otra podría ofrecer ventajas, según los objetivos planteados en cada estudio, para analizar la fisiología de la hemostasia y los efectos de fármacos que actúan sobre este proceso.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Los resultados de la presente investigación permiten concluir que:

- El tiempo de sangría fue significativamente menor en las ratas BIOU:Sprague Dawley.
- El recuento plaquetario en las líneas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague Dawley fueron similares.
- El tiempo de protrombina fue significativamente menor en el grupo de ratas de la línea BIOU: Sprague Dawley.
- No hubo diferencia significativa en el TPTa, el tiempo de coagulación y el fibrinógeno de las ratas BIOU:Wistar y las ratas BIOU:Sprague Dawley.

Recomendaciones

En relación con los resultados obtenidos se recomienda:

- Investigar la actividad plaquetaria, así como el número de eritrocitos y leucocitos de las ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley, con el fin de estudiar la causa de la diferencia encontrada en el tiempo de sangría de estas líneas de animales.
- Asociar la diferencia obtenida entre el TP de las ratas BIOU:Wistar y las ratas BIOU:Sprague Dawley con la concentración y actividad de los factores que participan en la vía extrínseca de la cascada de la coagulación.
- Realizar investigaciones farmacológicas con el fin de evidenciar diferencias en la respuesta de las ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague Dawley a la administración de fármacos antiplaquetarios y anticoagulantes.

REFERENCIAS

Alexander B, Goldstein R, Landwehr G, Cook CD. (1951). Congenital SPCA deficiency: a hitherto unrecognized coagulation defect with hemorrhage rectified by serum and serum fractions. *J. Clin. Invest.* 30: 596-608.

Angel G. (1993). *Interpretación Clínica del Laboratorio*. Bogotá Colombia; Editorial Medica Panamericana. 4ta Edición.

Barrios M, Acosta A, Gil A, Salazar A, Taylor P, Sanchez E. (2009) Comparative hemostatic Parameters in BALB/c, C 57BL/6 and CH3H/He mice. *Thromb Res.*124: 338-343.

Barnett S. 2002. *The story of rats: Their impact on us, and our impact on them*. Allen & Unwin.

Benavides F, Guénet J. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá (UAH) Madrid, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) y Laboratory Animals LTD.

Beristain-Covarrubias N, Perez-Toledo M, Thomas MR, Henderson IR, Watson SP, Cunningham AF. (2019). Understanding Infection-Induced Thrombosis: Lessons Learned From Animal Models. *Front Immunol.*10:2569.

Bernardoni C, Benito M, Benito M, Pereira S, Bracho M. (2004). Manejo odontológico del paciente con trastornos hemorrágicos. *Cienc Odontológica.*1: (1) 60–70.

Benito M, Morón A, Benardoni S, Bracho M. (2004). Manejo odontológico de pacientes con enfermedades hemorrágicas y terapia anticoagulante. *Acta Odontológica Venezolana.*42 (2): 138-145.

Bhagavan N, Ha C. (2015). Biochemistry of Hemostasis. Essentials of Medical Biochemistry. 637–660.

Brooks MB, Stokol T, Catalfamo JL. (2011). Comparative hemostasis: animal models and new hemostasis tests. Clin Lab Med. 31(1): 139-159.

Cooley BC, Chen CY, Friedman KD, Datta Y. (2005). A prothrombotic phenotype in the Copenhagen rat strain. Thromb Res.115 (1-2): 153-157.

Diez N. (2001). El factor de activación plaquetaria y su relación con el daño oxidativo. Revista Cubana de investigación Biomedica 20: (1) 64-69.

Donat C, Kölm R, Csorba K, Tuncer E, Tsakiris DA, Trendelenburg M. (2020). Complement C1q Enhances Primary Hemostasis. Frontiers in immunology, 11: 1522.

Duarte M. (2007). Coagulación: sistema biológico complejo. Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia, VIII (16-17) 83-96.

Foster J, Frost D. (2018). The History of the Rat. En: Boorman's Pathology of the Rat. Academic Press.

Ganong, W. (2006) Fisiología Médica (20ª ed.). México. Editorial Manual Moderno.

Gómez R. (1935). Estudio fisiológico sobre la coagulación sanguínea. Revista de la Facultad de Medicina. IV (2): 69-77.

González M, Parra O. (2011). Acción hemostática local del geranio (*Pelargonium zonale*) sobre la mucosa bucal de ratas Sprague Dawley. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes.

Guerrero B, López M. (2015). Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. Invest Clín. 56 (4): 432-454.

Hayakawa K, Mimura Y, Tachibana S, Furuya M, Kodama T, Aoki T, Hosokawa S, Fukui M, Shibata S, Yoshida M, Masuyama T, Narita T, Kuwagata M, Hisada S, Maki E. (2013). Study for collecting background data on Wistar Hannover [CrI:WI(Han)] rats in general toxicity studies comparative data to Sprague Dawley rats. J Toxicol Sci. 38(6):855-873.

Hoover P, Shchurin A, Hart E, Sha J, Hill A, Singer J, Nadeau J. (2006). Genetic background determines response to hemostasis and thrombosis. BMC Blood Disord. 5; 6:6.

Huaman C. (2019). Trabajo académico realizado en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Biológicos del Centro de Salud Acarí, Microred Acarí durante mayo 2015 - mayo 2016. Tesis de grado. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa- Perú. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/9117>.

Hume C. (1976). The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals. 5° ed. London: UFAW.

Hurtado J. (2010). El Proyecto de la Investigación. Comprensión holística de la Metodología y la investigación. Caracas-Venezuela. Sexta Edición. Editorial Quirón.

Kacew S, Festing M. (1996). Role of rat strain in the differential sensitivity to pharmaceutical agents and naturally occurring substances. Toxicol Environ Health. 47(1):1-30.

Kisui F, Fukami T, Nakano M, Nakajima M. (2020) . Strain and sex differences in drug hydrolase activities in rodent livers. *Eur J Pharm Sci.* (15): 142.

Kobayashi H, Shirasawa N, Naito A. (2021). Estrogen synthesis in the stomach of Sprague-Dawley rats: comparison to Wistar rats. *Exp Anim.*70 (1): 63-72.

Koolhaas J. (2010). The Laboratory Rat. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals.* 311–326.

Kopić A, Benamara K, Schuster M, Leidenmühler P, Bauer A, Glantschnig H, Höllriegl W. (2019). Coagulation phenotype of wild-type mice on different genetic backgrounds. *Lab Anim.* 53(1):43-52.

Krinke, G J. (2000). History, Strains and Models. *Handbook of Experimental Animals, The Laboratory Rat.* Academic Press.

Lemini C, Jaimez R, Franco Y. (2007). Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice. *Thromb.* 120 (3): 415-419.

López N. (2016). Pruebas de coagulación. *Acta Pediatr Mex.* 37(4): 241-245.

Lozier J, Nichols TC. (2013). Animal models of hemophilia and related bleeding disorders. *Semin Hematol.* 50(2):175-84.

Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, Faria A, Calhau C. (2015). High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte.* 5(1):11-21.

Martínez C. (2006). Mecanismo de activación de la Coagulación. Revista Médica del Instituto de Mexicano del Seguro Social. 44 (2): 51-58.

Martinuzzo M. (2017). Pruebas de laboratorio para la evaluación de la hemostasia: fundamentos básicos. Hematología. 21: 56-68.

Méndez R. Código de Ética para la Vida. Suárez E, Villalón ME, Barreto G, Landáez P, Mendoza R, editors. (2011) Caracas: Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias.

Mendoza N. (2008). Farmacología Médica. México. Editorial médica panamericana.

Ministerio del Poder popular de Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedicas. Fondo Nacional de ciencia, tecnología e innovación. 4 (7):26-30.

Miranda J, Eseberri I, Lasa A, Portillo M. (2018). Lipid metabolism in adipose tissue and liver from diet-induced obese rats: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley strains. J Physiol Biochem. 74 (4): 655-666.

Mohammed BM, Monroe DM, Gailani D. (2020). Mouse models of hemostasis. Platelets. 31 (4): 417-422.

Montes R, Herminda, Pérez A, Hurtado V. (2001). Fisiopatología de la Hemostasia. Mecanismos de activación e inhibición. Implicaciones funcionales. Hospital Medicine. 08 (53): 2797-2802.

Morales D. (2015). Bioética de la investigación preclínica en las ciencias biomédicas. Revista Cubana de Estomatología. 52(2):171-187.

Mrad de Osorio (2006). Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos Revista Colombiana de Bioética. 1 (1): 163-183.

Navia M, Yaksic N, Chambi E, Farah J, Philco P, Ostria C, Paye O, Sucre A, Tavera D. (2016). Coagulación y síndrome metabólico en habitantes de gran altitud (3600 a 4100 M.S.N.M.), La Paz - Bolivia. Cuad. Hosp. Clín. 57 (3): 41-51.

Ohkura N, Oishi K, Sakata T, Kadota K, Kasamatsu M, Fukushima N, Kurata A, Tamai Y, Shirai H, Atsumi G, Ishida N, Matsuda J, Horie S. (2007). Circadian variations in coagulation and fibrinolytic factors among four different strains of mice. Chronobiol Int. 24 (4): 651-669.

Oltra D, Mangas V, González A, Colon U, González M, Bermejo M. (2015). Drug gastrointestinal absorption in rat: Strain and gender differences. Eur J Pharm Sci. 12(78): 198-203.

Páramo J, Panizo A, Pegenaute E, Lecumberri R. (2009). Coagulación. Una visión moderna de la hemostasia. Revista Médica de la Universidad de Navarra. 53: (1) 19-23.

Pichler L. (2008). Parameters of coagulation and fibrinolysis in different animal species a literature based comparison. Vet. Med. Austria / Wien. Tierärztl. Mschr. 95: 282 – 295.

Quintana S.(2002).Actividades en hemostasia. Gaceta Médica Mexicana.138:(1) 47-51.

Quintana S, Martínez C.(2008). Modelo celular de la coagulación. Rev Hemost y Trombos. 2:(1) 59–65.

Quintero P, Sabacter, M, Chimenos E, López L. (2004). Hemostasia y tratamiento odontológico. Avances en Odontoestomatología, 20: (5) 247-261.

Ramírez Y, Ramnarine R. (2012). Efecto de la administración combinada de Ginko Biloba y del Ibuprofeno sobre la hemostasia en ratas Sprague Dawley. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes.

Romero H, Caraballo A. (2011). Hematología practica. 1era ed. Mérida: Universidad de Los Andes. Consejo de Publicaciones.

Rose R, Klemcke H. (2015). Relationship between Plasma Albumin Concentration and Plasma Volume in 5 Inbred Rat Strains. J Am Assoc Lab Anim Sci. 54(5):459-464.

Ruiz B, López M, Dionisio A. (2007) Evaluación de TP y TTP en sangre total. Rev Mex Patol Clin. 54(3):136-143.

Salvador N, Guillén J, Peralta J. (2011). Biología general y mantenimiento de las especies más utilizadas. En: Zúñiga JM, Orellana JM, Marí JT. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) Laboratory Animals Ltd. Universidad de Alcalá. España.

Sadoughi F, Maleki Dana P, Hallajzadeh J, Asemi Z, Mansournia MA, Yousefi B. Coagulopathy: Another side effect of coronavirus infection. (2021). J Cardiovasc Thorac Res.13(1):15-22.

Sedaño MC, Flórez J. (2014). Farmacología de la hemostasia, la coagulación y la fibrinólisis. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Farmacología Humana. Elsevier Masson. España.

Shankar A, Varadan B, Ethiraj D, Sudarsanam H, Hakeem AR, Kalyanasundaram S. (2021). Systemic arterio-venous thrombosis in COVID-19: A pictorial review. World J Radiol. 13(1):19-28.

Silvestre F, Requeni J, Simó J.(2006). Materiales hemostáticos en cirugía oral. *Dentum*. 61(1):20–4.

Sudo T, Ito H, Kimura Y. (2006). Genetic strain differences in platelet aggregation of laboratory mice. *Thromb Haemost*. 95 (1): 159-165.

Sudo T, Ito H, Hayashi H, Nagamura Y, Toga K, Yamada Y. (2007). Genetic strain differences in platelet aggregation and thrombus formation of laboratory rats. *Thromb Haemost*. 97 (4): 665-672.

Szpirer C. (2020). Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes. *J Biomed Sci*. 2; 27(1):84.

Taconic Biosciences. Sprague Dawley Rat. (s.f). Disponible en: <http://www.taconic.com/pdfs/sprague-dawley-rat.pdf>

Taffe M, Creehan K, Vandewater S, Kerr T, Cole M. (2021). Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) vapor inhalation in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Exp Clin Psychopharmacol*; 29 (1): 1-13.

Tarandovskiy ID, Shin HKH, Baek JH, Karnaukhova E, Buehler PW. (2020). Interspecies comparison of simultaneous thrombin and plasmin generation. *Sci Rep*. 10 (1): 3885.

Torres-Carrillo P, Vergel-Munguía M, Paz-Trejo D, Ochoa-de la Paz L, Zamora-Arévalo O, Sánchez -Castillo H. (2018). Diferencias intra-especie en respuesta al estrés: Hacia enfoques traslacionales. *Acta de investigación psicológica*. 8 (1): 61-71.

Urushidani T, Okabe S, Takeuchi K, Takagi K. (1978). Strain differences in aspirin-induced gastric ulceration in rats. *Jpn J Pharmacol*. 28(4):569-578.

Weitz J. (2011). Coagulación sanguínea y anticoagulantes, fibrinolíticos y antiplaquetarios. En: Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Interamericana Editores, S.A. México.

White T, Pan S, Witt T, Simari R. (2010). Murine strain differences in hemostasis and thrombosis and tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis research*, 125(1): 84–89.

Zamora G. (2012). Pruebas del coagulograma y componentes de la hemostasia. Utilidad para diagnosticar las diátesis hemorrágicas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 28 (2): 141-150.

www.bdigital.ula.ve