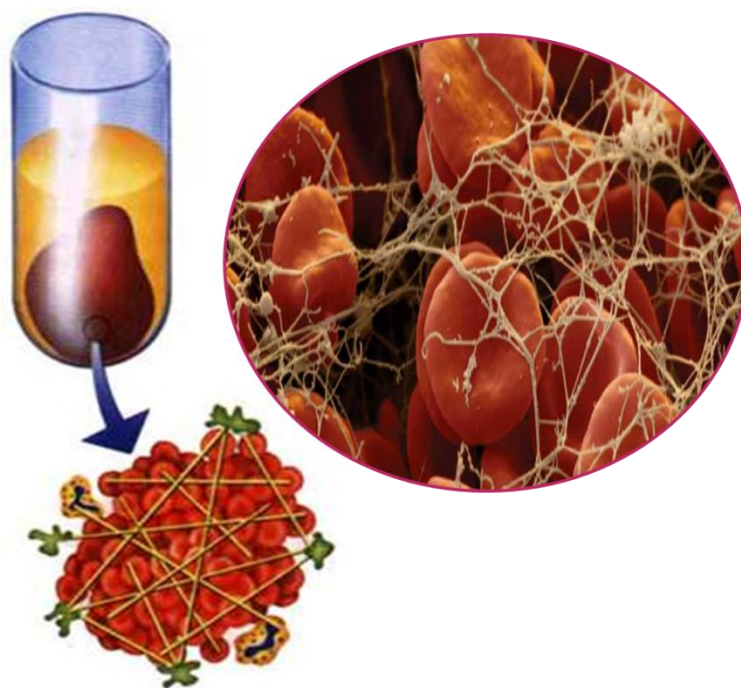




Universidad Nacional de Río Cuarto

EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN LA HEMOSTASIA



ANALISIS CLINICO-DPTO. CLINICA ANIMAL

Babini, S.; Benzoni, A.; Morilla, G.; Rossi, S.; Maffrand, C.

2022

Introducción

Se denomina hemostasia al proceso fisiológico y bioquímico por el cual se cohibe una hemorragia por medio de la formación de un tapón hemostático y su posterior lisis.

La valoración de la hemostasia puede ejecutarse mediante la realización de diferentes técnicas que pueden ayudar en el diagnóstico etiológico o establecer distintas alteraciones en los mecanismos fisiológicos de la hemostasia, valorar un tratamiento, seguimiento del paciente y emitir un pronóstico.

El presente material brinda una breve mención de las principales técnicas, que todo clínico debe conocer a fin de realizar una evaluación de los procesos que comprometen a la hemostasia.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA ALTERACIONES EN LA COAGULACIÓN

Tiempo de sangría (TS):

Esta es una técnica útil y sensible que se puede implementar en el consultorio en el momento de la atención clínica, cuando existe la sospecha de alteración en el mecanismo primario de hemostasia. Para ello se debe realizar una incisión con una lanceta estándar de 3 mm de profundidad por 3 mm de ancho, en zonas de microcirculación, como la cara interna del muslo o de la oreja, o bien en la mucosa bucal. La hemorragia que se produce en caninos normales cesa en un lapso de tiempo entre 1 a 5 minutos.

Esta prueba es el método más sencillo y eficiente para evaluar la función plaquetaria, disfunción vascular, vasculitis o/y enfermedad de von Willebrand.

Diagnóstico de deficiencia del FvW (factor de von Willebrand):

Se produce prolongación del TS debido a que se afecta la adhesividad plaquetaria, pero el recuento plaquetario se encuentra dentro de los valores de referencia. Cuando es necesario realizar un diagnóstico de certeza se puede recurrir a determinaciones más específicas que permiten dosar el FvW como la inmunolectroforesis (figura 1), inmunolectroforesis cruzada y el análisis multimérico.

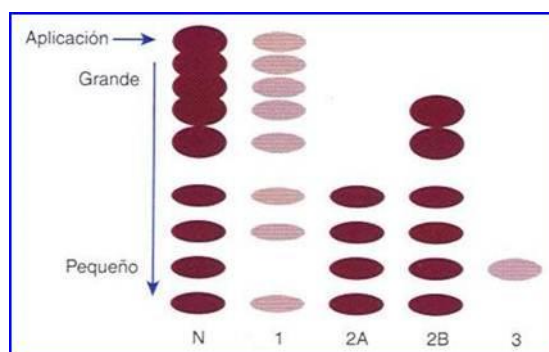


Figura 1. Análisis de multímeros del vWF por electroforesis. Fuente: Kodak, 2005.

Otras técnicas que son de utilidad para evaluar la actividad del factor de von Willebrand, a partir de la funcionalidad de las plaquetas, son: la agregación inducida y la adhesión plaquetaria.

Recuento Plaquetario:

Es el primer estudio de laboratorio que se debe realizar cuando se sospecha de trombocitopenia. Es una prueba sencilla y rápida que permite detectar trombocitopenias clínicamente importantes.

El recuento de las plaquetas se puede realizar por métodos directos mediante recuento

en cámara cuenta glóbulos o por contador electrónico (hematológico) (Figura 2) o por métodos indirectos por observación del frotis sanguíneo (Figura 3 y 4).

La muestra de sangre se debe recolectar con anticoagulante como sales del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y debe ser remitida al laboratorio para su análisis dentro de las 12 Hs posteriores a su obtención. El número de plaquetas es variable, dependiendo la especie, en caninos se considera normal un recuento entre las 3 200.000/ul a 500.000/ul de sangre.

Un canino puede tener tendencia a presentar sangrado cuando el número de plaquetas desciende a 40.000 /ul de sangre; mientras que la hemorragia espontánea ocurre cuando la cantidad de plaquetas se encuentra por debajo de las 20.000/ul de sangre.

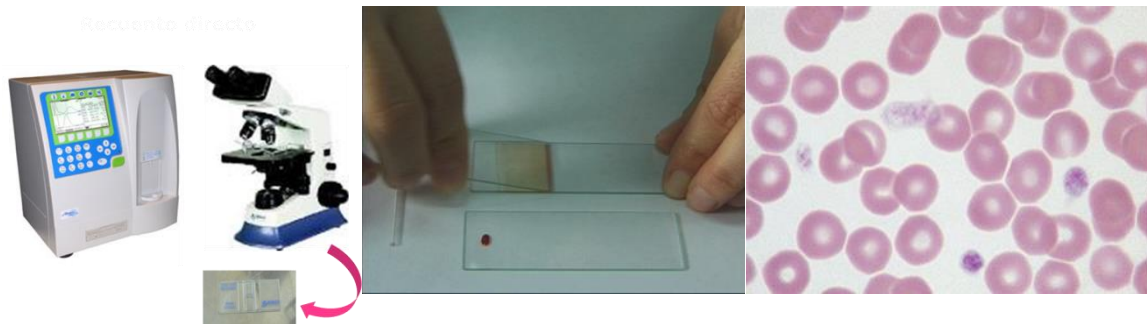


Figura 2. Recuento directo en contador hematológico y cámara cuenta glóbulos.

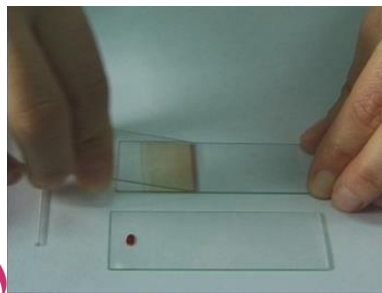


Figura 3. Recuento indirecto. Realización del frotis sanguíneo.

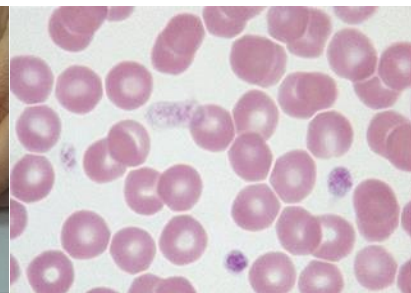


Figura 4. Recuento indirecto. Observación de frotis sanguíneo en microscopio óptico (MGG).



Actividades para estudio:

En el texto se mencionan dos métodos para estimar la cantidad de plaquetas, los métodos directos e indirectos. Investiga en que consiste cada método y realiza una síntesis de cada uno.

.....

.....

.....

.....

Retracción del coágulo:

Es una prueba sencilla, que permite evaluar la cantidad y la calidad plaquetaria. Este fenómeno es el que ocurre cuando se toma una muestra de sangre entera o una fracción de plasma rico en plaquetas, y se la deja reposar en un tubo de vidrio. La retracción normal ocurre entre los primeros 30 minutos y las dos horas posteriores a la toma de la muestra.

La retracción del coágulo y la exudación de suero son mínimas en caninos con Trombocitopenia y/o disfunciones plaquetarias. Además, este resultado se puede ver modificado en animales que padecen anemia y en tal caso se obtienen Tiempos de Retracción del Coágulo prolongados, por el contrario, aquellos animales que padecen policitemias severas, manifiestan acortamiento de dicho tiempo (6).

Examen de Médula Ósea:

Este estudio se debe realizar cuando la trombocitopenia es incierta y/o se encuentran reducidas otras líneas celulares (anemia o neutropenia).

En aquellas trombocitopenias que son resultado de un aumento en la destrucción y/o consumo, los megacariocitos que se observan en médula ósea usualmente son abundantes y presentan una secuencia de maduración normal, de lo contrario, en las hipoplasias de médula ósea, se observan escasos megacariocitos y está relacionada a una hipoproducción plaquetaria. La presencia de dos o tres megacariocitos por campo (Figura 5 y 6), con una magnificación microscópica de 100X, se considera una cantidad adecuada en una muestra de médula ósea.

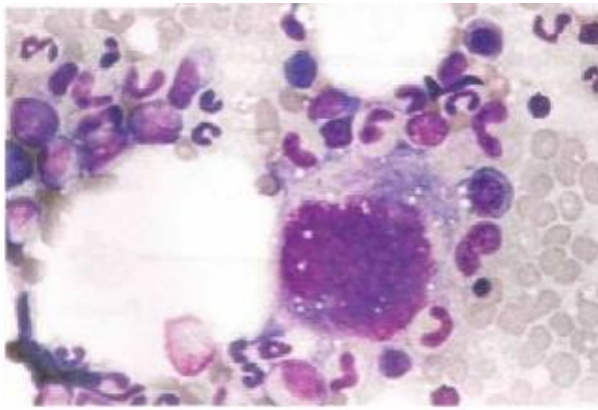


Figura 5. Megacariocito, precursores eritroides y granulocitos, Frotis de médula ósea canina. Objetivo 50x. Fuente: Reagan *et al.*, 1999.

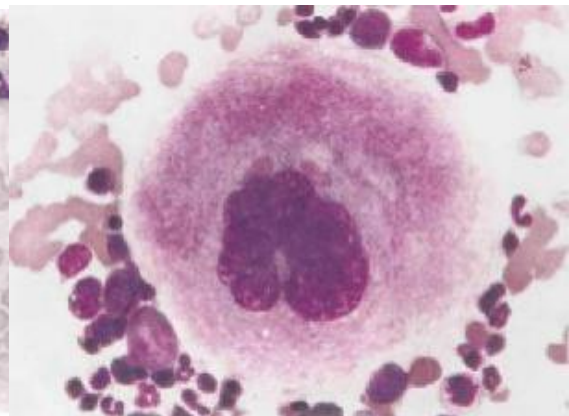


Figura 6. Megacariocito. Frotis de médula ósea canina. Objetivo 50x. Fuente: Reagan *et al.*, 1999.

Agregación plaquetaria:

Esta prueba se refiere a la capacidad de las plaquetas para adherirse entre sí, cuando se emplean agentes activadores como el ADP, la epinefrina, el colágeno, la trombina, el ácido araquidónico o la ristocetina. La medición de este fenómeno se realiza en un dispositivo óptico ⁴

especial que se denomina agregómetro y que mide el cambio en la densidad óptica, a medida que las plaquetas de la muestra se van agregando.

Para su realización se utiliza una fracción de plasma rico en plaquetas o también denominada costra flogística, obtenido a partir de una muestra sanguínea anticoagulada con el empleo de citrato. Es necesario que la muestra se procese con rapidez debido a que la viabilidad y reactividad de las plaquetas disminuyen a los pocos minutos de extraída la sangre.

Adhesión Plaquetaria:

Esta técnica permite evaluar la fijación de las plaquetas a cualquier superficie no plaquetaria. Para su desarrollo se utilizan columnas de bolitas de vidrio. Esta evaluación es de utilidad para el diagnóstico de defectos en la adhesión plaquetaria, así como en la enfermedad de von Willebrand.

En un animal normal el 75% de las plaquetas quedan adheridas a la superficie expuesta. Pero, se considera una disminución de dicha función, cuando sólo quedan retenidas a las columnas de vidrio entre el 0% y el 50% de las plaquetas.

Tiempo de Protrombina (TP):

Esta técnica permite evaluar la funcionalidad de los factores que intervienen en la vía extrínseca y la vía común de la cascada de la coagulación. Para ello se debe obtener plasma con citrato trisódico, el cual es un anticoagulante que forma un complejo con el calcio. Luego la muestra problema se recalcifica y se activa con tromboplastina tisular. Esta activación desencadena la formación de un coágulo que se inicia a partir de la vía extrínseca de coagulación.

Los coágulos de plasmas controles, correspondientes a animales en óptimas condiciones de salud, se forman entre los 10 y 15 segundos. Es importante considerar que la tromboplastina tisular es específica de especie, por lo cual es necesario disponer de extractos de tromboplastina homólogo a la especie en estudio o realizar una puesta a punto de los reactivos comerciales que contienen extracto crudo de factor tisular de cerebro o de pulmón de conejo.

Tiempo de Coagulación (TC):

Esta técnica permite evaluar la vía intrínseca y la vía común de la cascada de la coagulación. Para su realización se debe obtener sangre entera, con la precaución de no incorporar tromboplastina tisular a la muestra, y esto hace necesario la elección de una vena de fácil acceso.

En esta técnica la coagulación se desencadena a partir de la activación del factor XII, como consecuencia del contacto de la sangre con el vidrio de los tubos de recolección. Si bien esta técnica se emplea para diagnosticar alteraciones de la vía intrínseca de la coagulación, en estados trombocitopénicos graves con disminución severa de los fosfolípidos plaquetarios se 5

puede ver anormalmente prolongado.

Tiempo de Coagulación Activada (TCA):

Esta técnica permite evaluar la vía intrínseca y la vía común de la cascada de la coagulación. Para su realización se debe obtener sangre entera con las mismas precauciones consideradas para la técnica anterior.

En este caso la activación del factor XII se realiza con tierra de diatomea, que actúa como una superficie activadora inerte. El coágulo se produce más rápidamente con respecto al TC, de modo que la disminución del tiempo de reacción que se logra con el TCA hace que esta última sea una técnica más sensible. Una disminución severa de los fosfolípidos plaquetarios puede prolongar el tiempo de reacción.

Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA):

Esta técnica es un indicador del funcionamiento de los factores que participan en la vía intrínseca y en la vía común de la cascada de la coagulación. Para su realización se debe obtener plasma citratado, al que posteriormente se recalcifica y se activa con kaolín o celite. Estas sustancias actúan activando el factor XII y por lo tanto se desencadena el mecanismo intrínseco de la coagulación. Es necesario también agregar cefaloplastinas como sustitutos de los fosfolípidos plaquetarios, de modo tal que los responsables de la velocidad de la formación del coágulo son los factores del mecanismo intrínseco de la coagulación.

Tiempo de Trombina (TT):

Esta técnica es de utilidad cuando se pretende evaluar la funcionalidad y/o concentración del fibrinógeno (factor I). La formación del coágulo de la muestra de plasma citratado se produce como consecuencia del agregado de trombina exógena. La trombina que se incorpora actúa transformando el fibrinógeno en fibrina. Esta técnica es independiente del funcionamiento de los factores involucrados en la vía intrínseca y la vía extrínseca de la cascada de coagulación.

En la práctica diaria las pruebas más utilizadas son el TP y el TTPA o KPTT, las cuales consisten en mezclar muestras obtenidas en citrato con una sustancia que activa el sistema intrínseco (TTPA) o sistema extrínseco (TP) y cuantificar el tiempo que tarda en coagular la muestra. Si el tiempo es mayor al normal indica una deficiencia en uno o varios de los factores del sistema correspondiente.



Actividades para estudio:

Investiga cómo se informan e interpretan los TP y TTPA.



Es importante recordar que para realizar el recuento plaquetario el anticoagulante utilizado es el EDTA, el mismo que se utiliza para hemograma y para las pruebas de coagulación como TP, TTPA, TCA el anticoagulante es citrato

Diagnóstico de Deficiencia de Vitamina K y Antagonismo:

Durante la fase temprana de la intoxicación con warfarina, el factor VII desaparece rápidamente, y puede provocar prolongación del TP. Posteriormente también se pueden ver modificados el TTPA y el TC. El test de las PIVKA (proteínas inducidas por vitamina K antagonistas) detecta la presencia de proteínas inducidas por deficiencia de Vit K o antagonistas de dicha vitamina y es considerado el indicador más temprano, cuando existe deficiencia de los factores K dependientes.

Dímero D y PDFs

El dímero-D y los PDFs se producen por acción de la plasmina para degradar la fibrina formada en el proceso de coagulación. Por lo tanto aumentan cuando hay excesos de coagulación y a la vez una fibrinólisis, como ocurre en el síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID) y en pacientes con tromboembolismo.



Actividades para estudio:

¿Cuál es la diferencia entre Dímero-D y PDFs?

.....

Diagnóstico de Coagulación Intravascular Diseminada (CID):

Es una de las coagulopatías más frecuentes en medicina veterinaria y resulta secundaria a una amplia variedad de procesos mórbidos. Los resultados de laboratorio varían dependiendo de la causa desencadenante de este desequilibrio; y de la fase de la patología al momento del estudio: hipercoagulabilidad o hiperfibrinólisis.

Las pruebas relacionadas a la hemostasia que se pueden ver alteradas son: TP, TTPA, TC y TT. En todas las técnicas mencionadas se manifiesta un retardo con respecto a los valores de referencia. También se observa una disminución de la concentración del fibrinógeno y 7)

aumento de los PDFs (productos de degradación de Fibrinogeno-fibrina). Otras anormalidades incluyen una disminución del recuento plaquetario y de la ATIII (antitrombina III). Debido a la gran complejidad de este desequilibrio en la hemostasia, no existe una única determinación que resulte patognomónica.

Diagnóstico de Trombosis:

En la clínica de pequeños animales, las anormalidades en la hemostasia se pueden presentar con manifestaciones de hipercoagulabilidad y se produce la formación de trombos. Un trombo es el depósito intravascular de fibrina y elementos formes de la sangre que impide el flujo sanguíneo normal en las arterias, las venas, el corazón y la microcirculación. Es el resultado de un desequilibrio entre los mecanismos que favorecen la formación del coágulo y aquellos que lo inhiben y disuelven. Existen diferencias entre el trombo arterial y el venoso debido a una diferencia en la hemodinamia.

El trombo arterial (trombo blanco), está constituido fundamentalmente por plaquetas agregadas, pequeñas cantidades de fibrina y escasos leucocitos y eritrocitos.

El trombo venoso (trombo rojo) presenta mayor cantidad de elementos celulares y fibrina, con una escasa cantidad de plaquetas.

Estas formaciones pueden presentar un crecimiento continuado, llevando a la formación de placas fibrosas. El tromboembolismo es el resultado del desprendimiento de un trombo hacia los vasos sanguíneos, pudiendo obstruir los vasos de menor calibre, lo que ocasiona una disminución del aporte sanguíneo en el tejido afectado. La CID se puede manifestar como un cuadro trombótico.

La trombosis es de presentación poco frecuente en caninos a pesar de estar relacionada a muchas etiologías. El diagnóstico de este tipo de alteración es complicado y generalmente se debe recurrir a ultrasonografía y angiografía de contraste.

Al evaluar la concentración de ATIII de la muestra se observa una disminución, mientras que los monómeros de fibrina y los PDFs se ven aumentados. En la trombosis el sistema fibrinolítico es deficiente y esto se puede evidenciar con las siguientes pruebas:

A) Tiempo de Lisis del Coágulo (TLC): es el tiempo que tarda para lisarse un coágulo, cuando es mantenido a 37° C. El TLC en caninos se produce normalmente entre las 8 y las 20 horas.

B) Tiempo de Lisis de las Euglobulinas (TLE): Las euglobulinas del plasma tales como el fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, y activador del plasminógeno, precipitan cuando son diluidos en medio ácido, lo que no ocurre con los inhibidores del sistema fibrinolítico como la antiplasmina y el antiactivador del plasminógeno. El TLE mide el tiempo que tardan las euglobulinas en redisolverse, luego de haber sido precipitadas por la presencia de plasmina endógena.

C) Test de Placa de Fibrina (TPF): Con esta técnica se mide la capacidad que tiene una muestra de plasma para lisar una placa de fibrina estandarizada. La lisis que se produce 8)

depende de la concentración del plasminógeno y de los activadores del mismo, presentes en la muestra problema. Por lo tanto, el TPF permite evaluar las proteínas que están afectadas al sistema fibrinolítico. El resultado se expresa en milímetros de área de lisis.



Actividades para estudio:

A modo de resumen te proponemos completar la siguiente tabla, la que constituirá un resumen de las principales pruebas para evaluar las distintas fases de la hemostasia, te recomendamos para ello apoyarte en este material y en el contenido de la unidad 5 del programa de la asignatura Análisis clínico: **EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA: ANORMALIDADES DE LA COAGULACIÓN Y LAS PLAQUETAS**, en donde encontraras bibliografía recomendada.

Fases de la hemostasia	Elementos intervinientes	Pruebas para su evaluación
Hemostasia primaria		
Hemostasia secundaria		
Hemostasia terciaria Fibrinólisis		

Existe una técnica que permite una evaluación global de la hemostasia, el **tromboelastografo o tromboelastografía (TEG)**.

Esta técnica novedosa, aún no está disponible en todos los laboratorios de veterinaria, y en la actualidad se está investigando su alcance. Quizás uno de los puntos más relevantes es que permite detectar hipercoagulabilidad.

BIBLIOGRAFIA

Cerón Madrigal, J.J. 2013. Análisis Clínico en Pequeños Animales. 1ª ed. CABA, Intermédica. 400 p. ISBN: 978-950-555-417-1.

Coles, E. H. 1986. Diagnóstico y patología en Veterinaria. 4ta edición Interamericana. McGraw-Hill.

Coppo, J.A. 2010. Interpretación de Análisis Clínicos en perros y gatos. 1a edición. Universidad Católica de Salta-EUCASA.

Reagan, W.; Sanders, T.; DeNicofa, D. (Eds). (1999). HEMATOLOGÍA VETERINARIA Atlas de Especies Domésticas Comunes) HARCOURT BRACE ISBN: 84-87736-25-4

Schalm, O. W.; Jain, N.C.; Carrol, E.J. 1975. Veterinary hematology. 3rd edition. Lea & Febiger. Philadelphia.

Villiers, E; Blackwood, L. 2012. Manual de Diagnóstico de Laboratorio en pequeños animales. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA). Ediciones S, España. ISBN: 978-84-87736-69-8