



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Evaluación hematológica de la enfermedad de von Willebrand por tres técnicas diferentes de aproximación diagnóstica.**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

MARIELA ESTÍBALI JÁCOME CASTELLÓN

TUTOR PRINCIPAL:

DR. LUIS NÚÑEZ OCHOA.  
FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOZA  
FQ-UNAM

DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA  
INP

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **MIEMBROS DEL JURADO**

**Dr. Gerardo Garza Malacara**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Dr. Luis Enrique García Ortuño**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Dr. Luis Núñez Ochoa**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Dra. Araceli Lima Melo**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Dr. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a quien debo toda mi formación y por ser mi segunda Patria.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca.

Al Laboratorio Veterinario Experto Sur, México DF, por la beca LE05-2012 para los análisis del Proyecto.

A los Doctores Luís Núñez Ochoa, Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa, Miguel Ángel Alcántara Ortigoza por la importante contribución en el desarrollo del proyecto.

Quiero agradecer muy especialmente a mis queridos Doctores, Dra Peñaloza y Dr Eduardo Sánchez López por su apoyo constante y desinteresado hacia el proyecto, tomando tiempo de sus ocupadas agendas para revisiones, son dos de las mejores personas que he conocido, ejemplo de solidaridad, calidad humana, moral y ética inigualables, los quiero y estarán en mi mente y corazón siempre, la vida te pone delante “Ángeles” en forma de personas, ellos son el claro ejemplo.

A mis amigos especialmente a Karla Mollinedo Beltrán y Araceli Lima, gracias Karlita por ayudarme siempre en mis aprietos académicos, por desvelarte conmigo explicándome tantas cosas, gracias por sus desvelos Dra Arita y por enseñarme tanto. A Diana Pérez, querida amiga, a Isis Santos, a Eber Santiago, a Ivette Partida y Marco Ramírez, a Carlos Israel Rodríguez, gracias por formar parte de mi vida porque sé que todos y cada uno de Ustedes estarán “ahí” siempre que los necesite aunque pasen años sin vernos.

## **AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

Quiero agradecer especialmente al Dr. Luis Núñez Ochoa por brindarme su ayuda en todo momento.

Al Químico Carlos Virgen de IL Diagnostics, por proporcionarme el reactivo y material para realizar la determinación del antígeno del factor de von Willebrand y agradecer su tiempo y disposición.

A la Maestra Erika Rosales del Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, por brindarme todas las facilidades y el apoyo en el laboratorio de Hematopatología.

Y un agradecimiento particular para el Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Hematopatología del Departamento de Morfología de la ENCB, IPN.

La determinación del antígeno del factor de von Willebrand se realizó en el laboratorio de la misma institución donde se utilizó el equipo donado por la "Fundación Gonzalo Río Arronte" I.A.P a quien hago patente mi agradecimiento.

A la Dra. Elba Reyes Maldonado, Coordinadora de la Especialidad en Hematopatología del Departamento de Morfología de la ENCB, IPN.

## **DEDICATORIA**

**A mis amados padres Álvaro Jácome Rodríguez y Esperanza Castellón Palomera por su amor incondicional y ejemplo de vida.**

**A mi hermana Némesis y sus hijos Christian y Alexis por ser parte esencial de mi vida.**

**A Miguel Ángel Zamora Trujillo por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento, sabes que siempre estaremos juntos hasta el último suspiro amor.**

## ÍNDICE

<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Hemostasia .....</b>	<b>1</b>
<b>Factor de von Willebrand.....</b>	<b>4</b>
<b>Gen del factor de von Willebrand .....</b>	<b>7</b>
<b>Enfermedad de von Willebrand.....</b>	<b>7</b>
<b>Clasificación de la enfermedad.....</b>	<b>9</b>
<b>Susceptibilidad por raza .....</b>	<b>10</b>
<b>Diagnóstico.....</b>	<b>11</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>22</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>22</b>
<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>23</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>24</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>32</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>35</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>37</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>15</b>

## INDICE DE TABLAS. ANEXOS

<b>Tabla 1.</b> Características de la enfermedad de von Willebrand en diferentes razas de perros. ....	1
<b>Tabla 2.</b> Razas de perros más susceptibles a presentar la enfermedad de von Willebrand y porcentaje de perros portadores en diferentes países.....	1
<b>Tabla 3.</b> Diferencias clínicas entre alteraciones de la hemostasia primaria y secundaria.....	2
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de EvW en el perro de acuerdo a la concentración de FvW:Ag% según la Universidad de Cornell.....	2
<b>Tabla 5.</b> Pruebas diagnósticas para la evaluación de antígeno del factor de von Willebrand. ....	3
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Doberman Pinscher .....	4
<b>Tabla 7</b> Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Collie .....	4
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Fila Brasileiro .....	5
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Rottweiler .....	6
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Pastor Alemán .....	7

<b>Tabla 11.</b> Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Pointer Alemán .....	8
<b>Tabla 12.</b> Comparación por raza entre perros normales y deficientes, con base al % de actividad del FvW:Ag.....	9
<b>Tabla 13.</b> Comparaciones pareadas entre razas .....	9
<b>Tabla 14.</b> Resultado de las comparaciones pareadas entre las seis razas de perros .....	10

### ÍNDICE DE GRÁFICAS ANEXOS

<b>Gráfica 1.</b> Representación del número de plaquetas en frotis de los diferentes momentos de TSMO en perros deficientes del FvW:Ag.....	10
<b>Gráfica 2.</b> Resultado de las comparaciones pareadas entre las seis razas de perros .....	11

### ÍNDICE DE FIGURAS ANEXOS

<b>Figura 1.</b> Material utilizado para la extracción de muestra .....	11
<b>Figura 2.</b> Identificación del sitio de incisión para realizar TSMO en Fila Brasileiro y Pastor Alemán .....	12
<b>Figuras 3 y 4.</b> Realización del TSMO y frotis en las gotas del mismo en Rottweiler .....	13
<b>Figura 5.</b> ACL PRO 7000 y lectura en celdas por nefelometría .....	14

## RESUMEN

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es un defecto hemostático resultado de la deficiencia o anomalía del factor de von Willebrand (FvW), glucoproteína plasmática que tiene la función de adhesión y agregación plaquetaria a la pared vascular lesionada, y como protector del factor VIII de la coagulación. La EvW es el defecto hemostático hereditario más común en humanos y en perros, en el que afecta a más de 54 razas puras y mestizas. Los perros enfermos transmiten el rasgo genético para la enfermedad a su descendencia en donde presentan disminución en la concentración plasmática del antígeno de FvW que los predispone a mayor riesgo de hemorragias o muerte. El objetivo del presente trabajo fue evaluar tres pruebas hematológicas: cantidad del Antígeno del FvW (FvW:Ag) por prueba inmunológica, tiempo de sangrado de la mucosa oral (TSMO) y conteo de plaquetas en gotas de sangre provenientes del TSMO a diferentes segundos en **95** perros de seis razas diferentes. Debido a que en México se desconoce la incidencia de la enfermedad y así evitar la reproducción en las razas predispuestas, por lo que es necesario contar con pruebas para su diagnóstico principalmente en reproductores con presentación subclínica. De los individuos analizados, **92** fueron **no** consanguíneos. El **16.84%** de la población presentó menos de **49%** de actividad del FvW. La cuenta de plaquetas para los perros deficientes fue similar que para los normales y el tiempo de sangrado en perros normales tuvo valores entre **14 y 120** s con una media de **45.5** s. No hubo diferencia significativa en el conteo de plaquetas en las gotas de sangre a los diferentes momentos del TSMO. No se encontró correlación alguna entre las tres pruebas hematológicas.

**Palabras clave:** Factor de von Willebrand, enfermedad de von Willebrand, antígeno del factor de von Willebrand, tiempo de sangrado de la mucosa oral, conteo plaquetario.

## ABSTRACT

The von Willebrand disease (vWD) is a hemostatic defect that results from a deficiency or abnormality of the von Willebrand factor (vWF), plasma glycoprotein, which has the function of the platelet adhesion and aggregation to injured vessel wall, and plays a role protective for coagulation factor VIII. vWD is the most common hereditary hemostatic defect in humans and dogs, which affects more than 54 pure and mixed races. Sick dogs transmit the genetic trait of the disease to their offspring, which results in a decreased plasma concentration vWF antigen (vWF:Ag) that predisposes to bleeding or death. The aim of this study was to evaluate three blood tests: amount of the vWF:Ag by immunoassay, the buccal mucosal bleeding time (BMBT) and the platelet count from blood drops each 15 seconds of BMBT from 95 dogs of six different breeds. Because in Mexico the incidence of the disease is unknown, to avoid breeding predisposed breeds, is necessary develop diagnosis tests, in this way; mainly in dogs with subclinical presentation. Of the individuals analyzed, 92 were not consanguineous. The 16.84% of the population had less than 49% of vWF:Ag activity. Platelet counts for those deficient dogs were similar to normal dogs and the bleeding time in normal dogs had values between 14 and 120 s with a mean of 45.5 s. There was no significant difference in the number of platelets in the blood drops to different moments of the BMBT. There was no correlation between the three blood tests.

**Keywords:** von Willebrand factor, von Willebrand disease, von Willebrand factor antigen, buccal mucosal bleeding time, platelet count.



## INTRODUCCIÓN

### Hemostasia

La hemostasia es un proceso fisiológico complejo que involucra células (plaquetas, fibroblastos), proteínas solubles (factores de coagulación e inhibidores) y proteínas insolubles (proteínas de la matriz extracelular). Sirve como mecanismo de defensa cuya finalidad es conservar la integridad vascular (Mateo J, 2001), evitar la pérdida de sangre y asegurar la fluidez sanguínea y perfusión tisular, permite el funcionamiento adecuado de la sangre que lleva oxígeno, nutrientes y provee de mecanismos y células inmunes a todos los tejidos del cuerpo. La hemostasia, para su estudio, se divide en tres procesos principales los cuales corresponden a la hemostasia primaria, la hemostasia secundaria y la fibrinólisis (McCornnell MF, 2012; eClinPath, 2015).

Se evita la pérdida de sangre mediante la rápida formación de un coágulo en el sitio vascular lesionado, lo cual se consigue mediante la formación de un tapón de plaquetas, esta parte corresponde a la **hemostasia primaria**, posteriormente se estabiliza este tapón con una red de fibrina insoluble formada mediante la activación de la cascada de la coagulación, esta función corresponde a la **hemostasia secundaria**. Una vez que el vaso sanguíneo es reparado, se debe reestablecer el flujo sanguíneo normal, disolviendo el coágulo formado, lo cual corresponde a la **fibrinólisis**. Todo este proceso constituye un continuo y delicado equilibrio entre formación y disolución de coágulos, que puede ser alterado en cualquier dirección produciéndose anomalías hemostáticas, que constituyen entidades patológicas específicas (Troy GC, 1988; McCornnell MF, 2012).

Durante la hemostasia primaria se establece una importante interacción, principalmente entre dos componentes que son el endotelio vascular lesionado y las plaquetas que dan lugar a la formación del tapón plaquetario primario sellando la lesión de la pared vascular y frenando la hemorragia. La adhesión plaquetaria es controlada por el equilibrio entre dos prostaglandinas (tromboxano A<sub>2</sub> y prostaciclina) y es favorecida por diversas sustancias siendo una de ellas el FvW (Bustamante CG, Ticona SY; 2014). La hemostasia primaria es apoyada por vasoconstricción que provee a los vasos sanguíneos la capacidad de contraerse y disminuir su calibre reduciendo la presión hidrostática y la pérdida sanguínea (Organización Mundial de la Salud, 2001); estos movimientos del músculo liso de arteriolas y vénulas depende de una respuesta neurogénica, dada por un reflejo iniciado por receptores sensibles a la ruptura parietal que envían estímulos por medio de los nervios simpáticos al asta lateral de la médula espinal, la que responde con impulsos vasoconstrictores que viajan por las mismas vías simpáticas (Villanueva VJ, 2001) y es mantenida por acción de adrenalina y noradrenalina que se liberan a nivel local en las terminaciones nerviosas simpáticas, la vasoconstricción produce disminución de la circulación de la zona afectada disminuyendo la hemorragia (Buga CI, 2014). La hemostasia primaria es esencial para detener la salida de sangre en capilares, arteriolas pequeñas y vénulas.

La coagulación o hemostasia secundaria es la interacción de las proteínas plasmáticas o factores de coagulación entre sí que se activan en una serie de reacciones en cascada que conducen a la formación de fibrina, forman una malla insoluble y definitiva que refuerza el tapón hemostático primario construyéndose finalmente un coágulo definitivo.

Intervienen en el proceso proteínas procoagulantes (los 12 factores de coagulación responsables de la formación de fibrina) y proteínas anticoagulantes que regulan y controlan la coagulación evitando que los factores activados en un sitio específico se dispersen y produzcan coagulación generalizada, los más importantes inhibidores fisiológicos de la coagulación son: antitrombina, proteína C, y proteína S (Comp PC, 1990; Menache D, 1992; Panteleev MA *et al*, 2015).

El inicio de la coagulación de acuerdo con el modelo celular, establece que la coagulación es regulada por interacción del complejo factor tisular-factor VII activado (FT-FVIIa) y las propiedades de la superficie celular y no por la activación de dos vías humorales distintas (vía intrínseca y vía extrínseca de la coagulación). Explica que la vía extrínseca es la de mayor relevancia fisiopatológica *in vivo*; la coagulación inicia por exposición del factor tisular de células no vasculares que se ponen en contacto con la sangre durante la lesión tisular formándose el complejo FT-FVIIa en estrecha relación con la superficie de las plaquetas que activa los diferentes factores de coagulación para la generación de trombina.

La coagulación se produce en tres etapas interrelacionadas: la fase de iniciación, la cual se produce a nivel de células productoras de factor tisular (plaquetas, células endoteliales, fibroblastos y monocitos) que generarán pequeñas cantidades de factores Xa, IXa y trombina para iniciar el proceso. La fase de amplificación se lleva a cabo en la superficie de plaquetas activadas (por la trombina generada) que acumularan factores y cofactores en su superficie permitiendo el ensamblaje necesario para que se lleven a cabo las reacciones enzimáticas; finalmente, la fase de propagación en la cual las

proteasas se combinan con los cofactores en la superficie plaquetaria promoviendo la generación de grandes cantidades de trombina que resulta en activación del fibrinógeno y polimerización de la fibrina para formación del coágulo estable. Los monocitos y neutrófilos participan en una reacción inflamatoria local, los monocitos son inducidos a expresar factor tisular contribuyendo a la trombogénesis y curación de la herida (Páramo JA, 2009; Panteleev MA *et al*, 2015).

La fibrinólisis es el último proceso en el que se elimina la fibrina, que no es necesaria para la hemostasia con la finalidad de reparación del vaso y restablecimiento del flujo vascular; los principales activadores fisiológicos de la fibrinólisis son el activador tisular del plasminógeno y el activador tipo urocinasa del plasminógeno que difunden desde las células endoteliales y convierten el plasminógeno absorbido en el coágulo de fibrina en plasmina la cual degrada el polímero de fibrina en pequeños fragmentos que serán eliminados por monocitos y macrófagos (Carrillo ER *et al.*, 2003, Páramo JA, 2009).

#### **Factor de von Willebrand (FvW).**

El FvW es esencial en la hemostasia primaria debido a que es necesario para la adhesión y agregación plaquetaria, básicamente funciona como puente de unión entre las plaquetas con el subendotelio y entre plaquetas con la fibrina además de ser el portador y protector del factor VIII de la coagulación ya que evita que se degrade en circulación por actividad proteolítica de la proteína C activa (De Meyers SF, 2009).

El FvW es una proteína de fase aguda, enfermedades inflamatorias agudas, crónicas o procesos que alteran el endotelio vascular pueden ocasionar

valores anormalmente elevados del FvW. Condiciones como estrés, parto, ejercicio extremo o enfermedades virales y bacterianas, enfermedad hepática y síndrome nefrótico pueden elevar su concentración plasmática (Stokol, 1993; Rogers CL, 2010). Otras condiciones que afectan su concentración son las fluctuaciones hormonales, enfermedades endocrinas reducen su concentración (hipotiroidismo, hipoadrenocorticism) (Dodds, 1989; Meyers et al., 1992), el estro y la gestación también pueden variar su concentración plasmática (Moser J, 1998), Moser y colaboradores mencionan que la concentración del FvW no cambia durante el ciclo estral, sin embargo, refieren que la concentración del factor incrementa a medida que se acerca el parto observándose un pico máximo durante el mismo.

Las concentraciones plasmáticas homeostáticas del FvW son mantenidas por la liberación constitutiva de multímeros de menor peso molecular por las células endoteliales y el subendotelio. El FvW es producido por megacariocitos y células endoteliales que lo secretan o almacenan en su forma de pro- FvW en vesículas secretoras, conocidas como cuerpos de Weibel Palade. Las células endoteliales pueden liberar el factor a la circulación o en la matriz subendotelial, donde se une al colágeno (Gui-Ping L *et al*, 2012; Stokol, 2012). El FvW de plaquetas y megacariocitos es almacenado en gránulos alfa. Los perros tienen un porcentaje pequeño de FvW en las plaquetas (3%) en comparación con los humanos (10-25%) (De Gopegui RR, 1997).

La liberación del factor a partir de los cuerpos de Weibel Palade es inducida por histamina, vasopresina, trombina, fibrina y estrógenos. La liberación del FvW almacenado en los gránulos alfa de las plaquetas puede ser inducida por estímulo de agentes de agregación de plaquetas como colágeno, ADP, factor

activador plaquetario, adrenalina y trombina (De Gopegui RR, 1997). Las plaquetas, contienen numerosos tipos de receptores dentro y fuera de las balsas lipídicas como las GPIIb-IX-V y VI que son receptores involucrados con la unión de la plaqueta al FvW y al colágeno, respectivamente. El complejo GPIIb-IIIa, también conocido como integrina  $\alpha_{Ib}\beta_3$ , es un receptor importante para la agregación plaquetaria mediada por unión al fibrinógeno, sin embargo, estos complejos también pueden unirse al FvW y favorecer los estados tempranos de la adhesión plaquetaria al subendotelio (Bennett, 2005).

El FvW es una glucoproteína que circula como grandes multímeros, una cantidad reducida del mismo, se asocia con hemorragias (EvW), su elevación en cantidad o tamaño del multímero está implicado en la trombosis (Ghosh A, 2012). El FvW es importante en la formación del tapón hemostático primario, fue identificado por primera vez en 1971 por Zimmermann, posteriormente se designó como antígeno relacionado al factor VIII (Gui-Ping L *et al*, 2012). Se sintetiza como polipéptido individual que rápidamente se une a otro por puentes disulfuro, para formar dímeros inicialmente, luego se asocian en número variable para formar multímeros de gran tamaño, pueden estar compuestos por más de 100 subunidades que van de 500 a 20,000 kDa (Stokol, 2012).

Los multímeros de alto peso molecular son los más eficaces en el apoyo de la adhesión plaquetaria, Cualquier anomalía cuantitativa o cualitativa del FvW resulta en la formación incorrecta del tapón plaquetario permitiendo la hemorragia continua del vaso lesionado (Stokol T, 2012; Brooks *et al*, 2001).

La degradación biológica del FvW se lleva a cabo por acción de la proteína ADAMTS13, la cual rompe los multímeros en unidades menores que son

posteriormente degradados por otras peptidasas, la conversión se lleva a cabo lentamente en plasma; en condiciones normales, su vida media es de 12 horas (Dong JF, 2005).

### **Gen *FVW***

El gen *FVW* de humanos se encuentra ubicado 12p13.3 y se encuentra constituido por 52 exones a lo largo de 178 kb, en el que se ha informado diversas mutaciones que se traducen en alteraciones de estructura y/o funcionamiento de la proteína FvW.

En el **perro**, el gen *FVW*, se encuentra en el cromosoma 27 y presenta 87.1% de homología con el humano que se traduce en 86.2% de aminoácidos (Nichols et al., 2010). Se han encontrado mutaciones a lo largo del gen que son características de los diferentes tipos de EvW.

### **Enfermedad de von Willebrand (EvW)**

El paciente que llevó al descubrimiento del trastorno hemorrágico hereditario que ahora se conoce como enfermedad de von Willebrand fue una niña de 5 años de las Islas Aland, Finlandia, llevada a Helsinki en 1924 para ser vista por el doctor Erik von Willebrand quien la valoró e informó en 1926 por primera vez el trastorno hemorrágico que ahora se conoce como la enfermedad que lleva su nombre, caracterizada, por tiempos de sangrado prolongados y número de plaquetas normales o bajas. El doctor informó que se trataba de una enfermedad no descrita que difería de la hemofilia. Siete años después von Willebrand y Rudolf Jürgens describen la enfermedad como una trombopatía

hereditaria y tres décadas más tarde se denomina finalmente como EvW (National Institute of Health, 2007).

Con respecto a los perros, se describió a una familia de Pastor Alemán que presentaban un trastorno hemorrágico hereditario análogo a la EvW en humanos (Dodds WJ, 1970); sin embargo, también se menciona que el primer caso reportado fue en un perro de raza Terrier Escocés en 1972 (Meyers *et al.*, 1972).

Actualmente se considera a la EvW el trastorno de la hemostasia más común en perros y humanos, y ha sido reportado en otras especies como primates (chimpancé), gatos, cerdos, equinos, bovinos, rata, ratón, y conejo (De Gopegui, 1997; Brooks MB, 1991; Brooks MB, 2001; Rathgeber RA, 2010; Patterson MM, 2002; Fuster V, 1986; French TW, 1987; Sullivan PS, 1994).

Es causada por defectos cualitativos y/o cuantitativos en el FvW. EL FvW es activo principalmente en condiciones de alto flujo y tensión por lo que su deficiencia se hace evidente principalmente en órganos con pequeños vasos como mucosas, piel, útero y aparato digestivo. Los signos clínicos asociados con EvW son similares a los que se observan en humanos (Schwarz HP, 1998) como sangrados en mucosas, hemorragias de severidad variable después de cirugía, sangrado excesivo con la erupción dental, epistaxis, hematuria y sangrado gastrointestinal, entre otros.

Existe diferencia entre razas de perros en la proporción de portadores que realmente expresan el rasgo de la EvW donde la raza Airedale Terrier rara vez presenta sangrado a pesar de presentar baja concentración plasmática del FvW, a diferencia del Doberman Pinscher que es el que más sangrados

presenta, principalmente en tracto urogenital, mientras que en la raza Terrier Escocés el sangrado es en cavidad oral o nasal. Las diferencias en las manifestaciones clínicas de la EvW en perros de raza pura pueden reflejar defectos heterogéneos dentro del gen *FVW*, causando una variedad de anomalías en la producción, la estructura y función de la proteína del FvW (Brooks M, 1992). Además se debe tomar en cuenta que en la EvW, rara vez se observan hemorragias petequiales (Stokol T, 2012).

### **Clasificación de la enfermedad**

La EvW en humanos, se clasifica en tres categorías (tipo 1, tipo 2 y tipo 3) de acuerdo con la concentración plasmática del FvW, función y estructura de la proteína; esta clasificación también es aplicada al perro (Brooks MB, 1999).

La EvW tipo 1 representa la forma clínica menos severa y la tipo 3 la más severa, ambas están relacionadas a una disminución en la cantidad del FvW y la tipo 2 con la calidad de la proteína. La EvW tipo 1 se debe a deficiencia cuantitativa parcial en la que la concentración plasmática del FvW es baja (<50% de lo normal en plasma), pero la estructura y función de los multímeros es normal y completa. En la EvW tipo 2 se presentan variantes funcionales de la proteína FvW y muestra 4 subtipos distintos en humanos (2A, 2B, 2N y 2M) y sólo la tipo 2A ha sido descrita en animales; aquí es frecuente la pérdida preferencial de multímeros de alto peso molecular acompañada de baja concentración plasmática de FvW donde su capacidad de apoyar la adhesión plaquetaria es considerablemente reducida. Finalmente, en la EvW tipo 3 hay una disminución importante o ausencia de FvW en el plasma, los perros afectados muestran tendencias severas a hemorragia (Brook MB, 2010). El

cuadro 1 muestra las características de la enfermedad de von Willebrand en diferentes razas de perros.

La EvW tipo 1 es la más frecuentemente diagnosticada (60-80%) seguida de la tipo 2 (15-30%) y en último lugar la tipo 3 (5-10%) (Mattoso, 2010) tanto en humanos como en perros. Esto se relaciona con elevada tasa de mortalidad a temprana edad o mortinatos en cachorros que presentan la EvW tipo 3. En el cuadro 1 se muestran las características principales de los diferentes tipos de EvW.

Se ha descrito la EvW adquirida con relación a enfermedades endocrinas como el hipotiroidismo (Avgeris, 1999), otras publicaciones no han encontrado dicha asociación (Heseltine JC, 2005; Panciera DL, 1994). Otras enfermedades relacionadas a EvW adquirida en el perro son de carácter inmunomediado o condiciones neoplásicas como sarcoma de plasmocitos y leucemia mielocítica crónica.

### **Susceptibilidad de la EvW por raza**

La EvW ha sido descrita en más de 54 razas de perros en Estados Unidos, incluidas puras y mestizas con alta prevalencia principalmente en Doberman Pinscher, Airedale Terrier y Terrier Escocés (Littlewood JD, 1991; Stokol T, 1993). En el Reino Unido es más prevalente en Pastor Alemán, Cobrador Dorado, Schnauzer Miniatura, Corgi Galés de Pembroke, Manchester Terrier Estándar y Lobero Irlandés (Littlewood JD, 1987).

Otras razas predispuestas, populares en México, son el Akita Inu, Alaska Malamute, Basset Hound, Bóxer, Cocker Spaniel Americano, Dachshund, Gran Danés, Gigante de los Pirineos, Labrador, Schnauzer Gigante y Husky

Siberiano, todas estas razas presentan EvW tipo I. (De Gopegui, 1997). En el cuadro 2 se muestran las razas de perros más susceptibles a presentar la enfermedad de von Willebrand y porcentaje de perros portadores en diferentes países.

## **Diagnóstico**

La mejor prueba para determinar la EvW en perros requiere la determinación específica en plasma citratado del FvW:Ag (Burgess HJ, 2010; Mattoso CR, 2010). Cuando se presenta disminución menor al 20% en la concentración del FvW se observan signos clínicos. Se hereda como carácter autosómico por lo que afecta a ambos géneros al igual que en humanos.

Existen tres preguntas importantes cuando nos enfrentamos o sospechamos de sangrado en un animal: ¿El sangrado se debe a factores locales o es debido a una anomalía hemostática generalizada? Si existe desorden sistémico generalizado, ¿cuál es su origen? ¿Este defecto es genético o adquirido? Las anomalías hemostáticas pueden relacionarse con defectos vasculares, defectos plaquetarios cuantitativos o cualitativos, a deficiencias cuantitativas o cualitativas en una o más proteínas de la coagulación o a una combinación de éstos (Johnstone IB, 1982). La manifestación clínica del sangrado sirve como herramienta para ayudarnos a diferenciar entre anomalías plaquetarias o de coagulación. Junto con la historia clínica y el examen físico detallado se necesitan pruebas de laboratorio específicas para determinar la naturaleza del sangrado y establecer el pronóstico del problema, esto se puede complementar con la realización de un hemograma completo, un perfil bioquímico completo y

un urianálisis. (Johnstone IB, 1988). Los trastornos hereditarios normalmente se manifiestan en animales jóvenes y de razas específicas, algunos son ligados al sexo por lo que serán observados sólo en machos como la hemofilia A y B. En animales viejos, se observan anomalías en la hemostasia secundaria u otros trastornos por enfermedad hepática, cáncer, deficiencia de vitamina K por tratamiento prolongado con antibióticos o síndrome de mala absorción y se deben sospechar como primer causa. Los animales de cualquier edad, género y raza pueden ingerir raticidas o fármacos anticoagulantes; y pueden manifestarse estos trastornos hemorrágicos (eClinPath, 2015). En el presente trabajo se mencionarán las pruebas de rutina de la hemostasia haciendo énfasis en aquellas de importancia para el diagnóstico de la EvW. En el cuadro 3 se muestran las manifestaciones clínicas comúnmente expresadas que sirven para diferenciar entre defectos de hemostasia primaria y hemostasia secundaria.

A continuación se enlistan las pruebas de rutina y especializadas para evaluación de la hemostasia primaria; éstas implican el conteo del número de plaquetas, valoración de su función así como la determinación del FvW. La identificación de problemas vasculares requiere de signos clínicos específicos (púrpura, necrosis y úlceras especialmente en orejas, labios, mucosa oral, almohadillas, cola, escroto, etc) y pruebas específicas como evaluación histopatológica de biopsias (Argos Portal Veterinario, 2009).

- Evaluación de plaquetas

\*Cuantitativa y morfológica mediante el conteo plaquetario, evaluación morfológica en frotis sanguíneo y determinación del volumen plaquetario medio.

\*Función plaquetaria mediante la valoración de la adhesión, reacción de liberación, actividad procoagulante y agregación.

\*Pruebas globales (número y función plaquetaria): Tiempo de sangrado de la mucosa oral (TSMO), análisis de la función plaquetaria (PFA-100<sup>®</sup>), retracción del coágulo, tiempo de coagulación de la sangre total.

- Evaluación del Factor de von Willebrand

- \*Medición de la concentración del antígeno del factor de FvW:Ag

- \*Evaluación de la estructura del antígeno (multímeros)

- \*Actividad del factor: pruebas de unión a colágeno, agregación plaquetaria (agonistas específicos del FvW)

- \*Pruebas globales (función plaquetaria): tiempo de sangrado de la mucosa oral (TSMO), análisis de la función plaquetaria (PFA-100<sup>®</sup>).

- \*Prueba de ADN desarrollada por Veterinary Genetic Services (vetGen) para razas específicas (disponible en EUA).

- Evaluación de la pared vascular

- \*Biopsia

Las pruebas de la hemostasia secundaria implican la evaluación de factores de la coagulación o inhibidores. Algunas pruebas son muy especializados

(antígeno de fibrinógeno) por lo que sólo están disponibles en laboratorios selectos de EUA.

- Factores de coagulación

\*Pruebas de tamiz: Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), tiempo de protrombina (TP), tiempo de coagulación activada (TCA), tiempo de trombina (TT). Proteínas inducidas por ausencia o antagonismo a la vitamina K (PIVKA).

\*Actividad de un factor específico: la mayoría de los factores

\*Concentración de una proteína específica: antígeno del fibrinógeno

- Inhibidores

\*Actividad: Antitrombina, proteína C

\*Seguimiento terapéutico de heparina

\*Raticidas anticoagulantes: cromatografía líquida de alto rendimiento

\*Pruebas generales: tromboelastografía, pruebas de generación de trombina

La medición de muchos componentes de la fibrinólisis, incluyendo el plasminógeno, el activador tisular del plasminógeno y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) no se ofrece en México para la evaluación de animales con problemas de hemostasia o trombóticos. Las pruebas más comunes de la actividad fibrinolítica son la determinación de los productos de degradación de la fibrina y fibrinógeno (PDF's) y el dímero D.

\*Productos de degradación: PDF's, dímero D

\*Actividad de la proteína o concentración: activador tisular del plasminógeno, plasminógeno

\*Pruebas generales: tiempo de lisis de euglobina, métodos viscoelásticos utilizando activador tisular del plasminógeno

\*Inhibidores: PAI-1

●Pruebas generales de hemostasia (estas pueden medir simultáneamente múltiples vías, incluyendo la contribución celular (plaquetas, eritrocitos).

\*Métodos viscoelásticos: tromboelastografía y tromboelastometría

\*Trombinografía automática calibrada (CAT): Pruebas de generación de trombina

Los resultados de las pruebas de hemostasia nunca deben interpretarse en forma aislada sino en contexto con el paciente (sexo, raza, edad, exposición a patógenos específicos como *Ehrlichia* spp anticoagulantes raticidas, signos clínicos, historia clínica, carga genética etc), la interferencia analítica puede ocurrir produciendo falsos positivos o negativos; si los resultados no tienen sentido, deberán ser cuestionados. Se debe tratar al paciente, no a los resultados de laboratorio.

A continuación se expone un algoritmo de pruebas de diagnóstico que se sugiere para un paciente con problemas de hemostasia.



1. Las pruebas moleculares para la EvW se realizan en razas para las que la prueba está disponible (VetGen), sin embargo ésta no necesariamente se correlaciona con signos clínicos.
2. La trombopatía (disminución de la función plaquetaria) no es causa frecuente de hemorragia pero puede ser hereditaria o secundaria a fármacos (aspirina, AINES etc.), enfermedad (síndrome urémico, enfermedad hepática, CVD), exposición a toxinas, entre otras.
3. Pruebas adicionales son necesarias para valorar CVD (concentración de fibrinógeno, PDF's, dímero D, etc.). Si hay alta sospecha de CVD (sepsis, cáncer, inflamación severa, anemia hemolítica inmunomediada) considerar evaluación de CVD y recuento de plaquetas.
4. La medición del FVIIa puede ser utilizado en deficiencias de vitamina K con preferencia sobre PIVKA. La deficiencia de vitamina K puede deberse a intoxicación, mala absorción de grasa o enfermedad extrahepática (colestasis).

Modificado de Cornell University College of Veterinary Medicine. <http://www.eclinpath.com/hemostasis/diagnostic-evaluation/>

La EvW sólo puede diagnosticarse utilizando pruebas de laboratorio para la evaluación directa del FvW o para examinar si hay mutaciones en el gen del *FVW*, los perfiles de coagulación de rutina (conteo plaquetario, tromboplastina parcial activada y tiempo de protrombina) en animales con EvW generalmente están dentro de los intervalos de referencia. Se requiere efectuar pruebas de laboratorio a cualquier perro (especialmente de razas con elevada prevalencia de EvW) con historia de hemorragia y perfil de coagulación y cuenta plaquetaria normales. Hay varias pruebas diagnósticas para evaluar la EvW que incluye pruebas genéticas, pruebas cuantitativas basadas en ensayos inmunológicos como en el presente trabajo, y pruebas cualitativas basadas en la capacidad de FvW para participar en la agregación plaquetaria en respuesta a agonistas específicos in vitro (Stokol, 2012).

En medicina veterinaria, la EvW se suele diagnosticar mediante la cuantificación del FvW plasmático (FvW:Ag). En ciertas razas de perros, la mutación del gen puede ser detectada utilizando nuevas técnicas genéticas (VetGen®).

La prueba de electroinmunoensayo de “Laurell y rocket” es la técnica más utilizada para medir el FvW:Ag en Reino Unido, es en Estados Unidos la prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) la más utilizada. Los resultados obtenidos a partir de cualquiera de los inmunoensayos se utilizan para definir el estatus de la EvW en el paciente, sin embargo, ningún inmunoensayo mide la actividad funcional del FvW; esto sólo puede ser evaluado in vivo utilizando el TSMO o bien in vitro mediante la agregación plaquetaria. En el cuadro número 5 se exponen las principales pruebas diagnósticas realizadas para la evaluación de EvW en perros.

Dentro del panel de pruebas utilizadas para diagnosticar la EvW a nivel mundial se encuentra la medición del FvW:Ag, en la que se cuantifica el FvW plasmático en inmunoensayos con anticuerpos anti-FvW. La proteína que se mide en plasma citratado debe ser preferentemente separado del paquete celular inmediatamente posterior a la toma de muestra o máximo dos horas posteriores a la toma de la muestra. Se ha demostrado que el FvW:Ag en plasma almacenado a 4°C o a 22°C es estable hasta por 48 horas (Jhonson et al, 1991). La muestra de sangre para determinación del FvW:Ag debe recogerse de animales en reposo, y dar un plazo de dos semanas ante cualquier signo de estrés, enfermedad, gestación o estro, antes de realizar la toma de muestra (Stokol 2012).

Esta prueba mide la cantidad o la concentración de FvW y se informa el resultado de cada perro como porcentaje de actividad del FvW:Ag en comparación con un estándar de 100%. Perros que presentan FvW:Ag por debajo del 50% están en riesgo de transmitir o expresar el rasgo EvW. En general, los perros más gravemente afectados presentan reducción de menos del 15-20%.

Los métodos utilizados para extraer, procesar y enviar las muestras son importantes para obtener resultados precisos. Las muestras con coágulos o hemólisis son las más propensas a producir resultados inexactos cuando se realizan con técnicas como ELISA, en este estudio dichas alteraciones no interfieren puesto que se realizó una prueba inmunológica. La concentración plasmática del FvW fluctúa de un día a otro en perros normales y saludables. Los valores basales de FvW:Ag son predictores genéticos más precisos para el

estado de la EvW. Los cachorros pueden ser muestreados desde las 6 a 8 semanas de edad (De Gopegui RR, 1997, Universidad de Cornell).

Estudios realizados por Johnson *et al*, 1985, Brooks *et al* 1992, y Stokol *et al* 1995 demostraron que los perros de la raza Doberman Pinscher con presentaciones clínicas de la EvW tenían concentración del FvW:Ag inferiores al 35%. En Australia se utiliza esta concentración como punto de corte de referencia arbitrario por debajo del cual, los perros son considerados en riesgo de hemorragia. En Reino Unido se utiliza un punto de corte del 40% del FvW:Ag. La hemorragia más severa se produce en perros con concentraciones bajas del FvW:Ag. (<20%).

La Universidad de Cornell en EUA, presenta límites para la interpretación de los resultados de la medición del FvW:Ag mediante la técnica de ELISA, mismos que tomamos como referencia para determinar el estado de los perros del presente estudio. Los datos se encuentran en la cuadro 4.

Otra prueba importante para evaluar la EvW son los tiempos de sangrado debido a que la deficiencia del factor puede provocar sangrados prolongados. El tiempo de sangrado es la duración de hemorragia a partir de una pequeña herida que involucra sólo los vasos sanguíneos microscópicos. Un tiempo de sangrado prolongado es el sello distintivo de la EvW en humanos. Lamentablemente el sangrado de piel ha demostrado ser difícil de estandarizar en perros debido a la variabilidad en el espesor de la piel canina y a la rapidez del sistema de coagulación. En perros se utiliza el tiempo de sangrado de la mucosa oral (TSMO) técnica que *in vivo* evalúa la hemostasia primaria. Para realizar esta técnica, el perro debe ser sujetado en decúbito lateral, una tira de

5 cm de gasa se sujeta alrededor del maxilar para doblar el labio superior. La gasa no debe estar apretada pues puede retardar el retorno venoso causando moderada congestión de la superficie mucosa. Posteriormente un dispositivo por resorte de dos hojas (Simpla II. Organon Teknika Corporation, Jessup, Maryland) se utiliza para hacer dos incisiones de 5 mm de largo por 1 mm de profundidad en el labio superior. La incisión se realiza en sitios desprovistos de vasos sanguíneos visibles, la cabeza se inclina para que la sangre derramada fluya por gravedad hacia la boca del perro. Exactamente al momento de realizar las incisiones se pone en marcha un cronómetro. La gota de sangre que escurre debe ser quitada aproximadamente cada 5 segundos con papel absorbente con el que se toca solamente la gota. Se debe tener cuidado para evitar la tocar directamente los sitios de incisión. El punto final del tiempo de sangrado se detecta cuando el borde del papel no se tiñe de color rojo. Con esta técnica, los tiempos de sangrado para perros normales oscilan entre 1.7 y 4.2 minutos, con una media de 2.6 minutos (Jergens AE, *et al* 1987). Perros con FvW:Ag inferiores a 20% presentan TSMO prolongados debido a que su sistema de hemostasia primaria está comprometido. Se puede utilizar la técnica de TSMO como evaluación prequirúrgica en perros predispuestos genéticamente a presentar la enfermedad (principalmente en Doberman Pinscher) con estatus de EvW desconocida.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que las patologías que pueden producir trastornos en la hemostasia primaria pueden confundirse con el diagnóstico de la EvW, es necesario contar con pruebas de laboratorio que permitan su identificación; es por esto que se plantea el presente proyecto de investigación utilizando tres pruebas, la prueba de referencia que es la medición del factor a través de la determinación del FvW:Ag, la evaluación del TSMO y finalmente se propone el conteo de plaquetas en las gotas de sangre en diferentes momentos del TSMO.

En México se desconoce la prevalencia de la EvW en perros tanto de las razas predispuestas como de otras aún no informadas, por lo que se hace necesaria su detección por pruebas de laboratorio, ya que los perros afectados no exhiben ninguna anomalía en los resultados de laboratorio de rutina, siendo evidente, sólo el sangrado sin causa aparente. De esta manera, es necesario contar con pruebas de campo para el diagnóstico de la EvW lo que permitirá disminuir su prevalencia eliminando a los animales afectados que se emplean para la reproducción.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar tres pruebas hematológicas para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en 95 perros de seis razas, algunas de ellas, predispuestas a la enfermedad.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la concentración sanguínea de FvW en seis razas de perros a riesgo en México
2. Determinar si la prueba de tiempo de sangrado, como prueba de campo, es sensible para la detección de la enfermedad de von Willebrand.
3. Determinar si la prueba de conteo plaquetario, en las gotas de sangre del tiempo de sangrado de la mucosa oral como prueba de campo, es sensible para la detección de la enfermedad de von Willebrand.
4. Determinar si en conjunto las tres pruebas son complementarias.
5. Determinar la prevalencia de la enfermedad de von Willebrand en la muestra estudiada.

## **HIPÓTESIS**

Las tres pruebas a evaluar sirven para el diagnóstico de la Enfermedad de von Willebrand en perros susceptibles.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Estudio prospectivo longitudinal en el que se analizaron 95 perros de raza pura de seis razas seleccionadas: 32 de raza Pointer Alemán (4 Pointer Alemán de pelo duro y 28 Pointer Alemán de pelo corto), del criadero "Afirmé" ubicado en Naucalpan de Juárez, Estado de México. 18 Pastor Alemán de los cuales 9 del criadero "von Carmen" y otros 9 del criadero "Tomages", ambos de México DF. 16 Perros de la raza Rottweiler fueron muestreados del criadero "Tomages" así como 14 perros de raza Fila Brasileiro. 10 perros de raza Collie del criadero "Valoz Kennel" de la Ciudad de México DF y finalmente se tomaron muestras a 5 perros de raza Doberman Pinscher de propietarios particulares. Todos estos perros cuentan con documentos que validan su pureza racial con al menos un documento denominado Certificado de Pureza Racial (CPR) expedido por la Federación Canófila Mexicana (FCM) con validez en la República Mexicana, o bien con Certificado Internacional de Pedigrí con validez en los Países afiliados a la Federación Cinológica Internacional (FCI) con sede en Bélgica.

De estos perros, 4 fueron consanguíneos (una perra raza Rottweiler con sus tres cachorros) por lo tanto, hubo 92 perros adultos no emparentados. Los cachorros tenían en ese momento 4 meses de edad que cumple con lo que se sugiere para la medición del factor (a partir de las 14 semanas) (Mansell PD, Parry BW; 1992). Para la determinación del FvW, la sangre fue tomada de animales en reposo, sanos, libres de estrés o enfermedad. Ninguna de las hembras estaba gestante, en estro, recién parida ni en lactación. Debido a que se ha reportado el incremento en las concentraciones plasmáticas de FvW en

perras gestantes (Moser J *et al*;1998) y en humanos bajo entrenamiento, ejercicio y estrés (Gopegui RR y Feldman BF; 1997), se trató de realizar la contención para toma de muestras de los perros lo más rápido posible bajo condiciones mínimas de estrés.

### **Colección de muestras**

Primero, se tomó la muestra sanguínea en la vena cefálica o yugular previa asepsia del área con alcohol al 70%. Se realizó la toma de muestras de vena yugular a 5 perros, las otras 90 fueron de la vena cefálica; para llevar a cabo el procedimiento, se colocó una ligadura arriba de la articulación del codo para interrumpir el retorno venoso y localizar la vena cefálica durante un máximo de diez segundos para la venopunción con aguja hipodérmica de diámetro 22 G de 1½ pulgadas de longitud para ambos sitios anatómicos. Inmediatamente después de la toma de muestra se depositó la sangre en dos tubos especiales, un tubo con citrato de sodio al 3.2 % marca BD Vacutainer® de plástico con capacidad de 1.8 mL con una proporción de una parte de anticoagulante y 9 partes de sangre, se homogenizó mediante 4 inversiones para realizar la determinación del FvW:Ag en el analizador automatizado para pruebas de coagulación; en otro tubo BD microtainer® EDTA K<sub>3</sub> 500 µL se colocó la sangre y se homogenizó por inversión 10 veces, con esta muestra, se realizó un hemograma completo de forma manual y de forma automatizada en un aparato para hematología (Boule's hematology system, Medonic CA 620; Suecia). La toma de muestras se realizó de forma limpia y rápida sin volver a

realizar venopunción en la misma vena en ninguna ocasión. La figura 1 muestra el material utilizado para la toma de muestras de sangre.

La técnica de TSMO se realizó mediante la técnica estándar con algunas variantes (posición del perro a la toma de muestra, cambio de papel absorbente por laminilla portaobjetos y uso de lancetas para punción de piel estéril desechable manual, metálica, atóxica de punta triangular libre de deformaciones longitud con punta de 3 mm, empacada individualmente de la marca Ruisanchez® en lugar de dispositivo por resorte). Los perros fueron inmovilizados ya sea sentados o en cuadripedestación, a continuación, se eligió un sitio de la mucosa libre de grandes vasos sanguíneos y se colocaba una gasa en el maxilar superior como está descrito (Johnson GS *et al*; 1988), se tomaban dos lancetas para punción de piel alineadas verticalmente para realizar la punción del belfo y hacer en la mucosa dos incisiones (Figura 2). En vez de absorber la gota de sangre con papel, se tomaron las gotas de sangre que caían por gravedad 2 mm por debajo de los cortes realizados con una laminilla portaobjetos de 1 mm de espesor y se realizaron los frotis sanguíneos, las gotas se recolectaron para realizar un extendido sanguíneo con tiempo cronometrado a 15, 30, 60, 90 y 120 segundos hasta que las lesiones causadas pararon de sangrar (Figuras 3 y 4).

### **Pruebas realizadas**

A cada perro se le realizaron las tres pruebas, primero, las muestras de sangre depositadas en los tubos con citrato de sodio fueron centrifugadas a 2500 g por 15 minutos inmediatamente después de ser obtenidas y se depositaron en

alícuotas de plástico identificadas por cada animal, los plasmas obtenidos se depositaron en hieleras con abundante hielo para su traslado que fue menor de dos horas para ser almacenadas a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis en menos de un mes posterior a la toma de la muestra, como es recomendado (Stokol T y Parry BW; 1995). La determinación del FvW:Ag se realizó por la técnica de inmunoturbidimetría mediante inmunoanálisis para la determinación cuantitativa del FvW: Ag en plasma citratado en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional en el analizador centrífugo automatizado para pruebas de coagulación con sistema de detección nefelométrica de 90 a 160 nm y absorbancia de 180 a 405 nm ACL ELITE PRO (Figura 5) el cual procesa pruebas coagulométricas, cromogénicas e inmunológicas, siendo ésta última la utilizada para cuantificar el FvW mediante inmunoensayo automatizado en los sistemas de coagulación de IL para la determinación cuantitativa de FvW (FvW:Ag), en plasma citratado por turbidimetría de partículas de látex. La justificación para realizar la prueba mediante la técnica de inmunoanálisis en partículas de látex para la determinación cuantitativa del FvW:Ag en plasma citratado es falta de disponibilidad de la prueba, la ELISA específica para perros y a que el epítipo de la proteína del FvW está altamente conservada filogenéticamente entre diversas especies y la homología de la proteína con la humana supera más del 80% (Brooks MB y Catalfamo JL; 2011) por lo que es válido llevar a cabo el estudio. El ensayo FvW:Ag es una inmunoturbidimetría amplificada con partículas de látex que permite cuantificar FvW:Ag en plasma; cuando se mezcla el plasma que contiene FvW:Ag con el Reactivo Látex y el amortiguador de Reacción, las partículas de látex aglutinan. El grado de aglutinación es

directamente proporcional a la concentración de FvW:Ag contenida en el plasma y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causada por los agregados. Los resultados son expresados en porcentaje de actividad del FvW:Ag según las especificaciones del kit.

Esta prueba se empleó como prueba de referencia para la determinación del FvW y se consideraron como perros con EvW cuando los valores fueron inferiores al 50% de los valores de referencia en perros (6 µg/mL) que corresponden a 100 unidades caninas por decilitro (UC/dL) que a su vez es equivalente al 100% de actividad (Johnson GS *et al* 1988, Books MB, Catalfamo LJ; 2010).

Se llevó a cabo la técnica del TSMO iniciando el conteo cronometrado desde el momento en que se realizaban las incisiones hasta la formación del coágulo y sin sangrado, los resultados fueron anotados en un registro con el tiempo transcurrido para cada perro.

Durante el TSMO, se realizaron los extendidos sanguíneos de gotas de sangre del mismo, a los 15, 30, 90 y 120 segundos posteriores a la realización de las incisiones, los frotis fueron teñidos con colorante Wright que es de tipo Romanowsky para realizar el conteo plaquetario. El conteo de las plaquetas se llevó a cabo en zonas de monocapa celular. Se evaluaron 5 campos a 1000 aumentos y se tomó el promedio de plaquetas contadas para su reporte, este promedio se multiplicó por 20 para obtener el número de plaquetas  $\times 10^9/L$  (Stockham SL y Scott MA, 2008).

Por último, se realizó un hemograma completo a las muestras con EDTA incluyendo su análisis en el contador electrónico Medonic CA620,

determinación de microhematocrito y sólidos totales por refractometría (resultados no incluidos), diferencial de leucocitos, estimación plaquetaria y evaluación morfológica en frotis sanguíneo teñido con Wright.

En los casos que fue posible, a los animales considerados como deficientes (<50% FVW:Ag) se realizaron los tiempos de coagulación (TP y TTPa), siendo normales en todos los perros.

## Pruebas estadísticas.

Con el fin de determinar si existe una coincidencia en cuanto a los resultados de los conteos plaquetarios (CP) de los extendidos sanguíneos de gotas de sangre, a los 15, 30, 90 y 120 segundos del TSMO y el TSMO con la prueba estándar: determinación del FvW:Ag por la técnica de inmunturbidimetría mediante inmunoanálisis y dado que se trataba de datos categóricos se llevó a cabo una prueba de concordancia entre los resultados de la CP con los de la determinación del FvW:Ag se aplicó la prueba Kappa de Cohen como medida de concordancia utilizando la siguiente fórmula (Sheskin, 2003):

$$\kappa = \frac{\sum O_{ij} - \sum E_{ij}}{n - \sum E_{ij}}$$

Donde:  $i=j$  y

$O_{ij}$ : Frecuencia observada de la celda  $ij$

$E_{ij}$ : Frecuencia esperada de la celda  $ij$

$n$ = Número total de observaciones.

El criterio utilizado para establecer una posible concordancia es el siguiente. (Landis y Koch :1977) y (Viera y Garret :2005).

<b>Kappa</b>	<b>Estimación del grado de acuerdo</b>
<0	No acuerdo
0.0-0.2	Insignificante
0.2-0.4	Bajo
0.4-0.6	Moderado
0.6-0.8	Bueno
0.8-1.0	Muy bueno

La evaluación de la presencia de diferencias en la prevalencia del factor entre las razas de perros fue realizada mediante el procedimiento de comparación de más de dos proporciones estableciendo como  $H_0: P_1=P_2=\dots=P_k$  contra la alternativa de que las K proporciones son diferentes, aplicando el siguiente estadístico (Zar: 2003):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^K \frac{(X_i - n_i \bar{p})^2}{n_i \bar{p} \bar{q}}$$

y

$$\bar{p} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Donde:

$X_i$ = Número de individuos positivos

$n_i$ = Número total de individuos

$\bar{p}$ = probabilidad de éxito

$\bar{q} = 1 - \bar{p}$

En caso de rechazo de la hipótesis nula se determinó específicamente cuales proporciones poblacionales son diferentes mediante un procedimiento de comparación múltiple de proporciones (Zar: 2003) el cual se basa en el siguiente estadístico de prueba:

$$q_c = \frac{p'_a - p'_b}{EE} \sim q_t = 4.03_{(\alpha=.05)} \text{ y } 4.75_{(\alpha=.01)}$$

Donde:

$P'_a$ = Proporción mayor

$P'_b$ = Proporción menor

EE= Error estándar

Y se estableció como regla de decisión que, si  $q_c > q_t$  se rechaza  $H_0: P'a = P'b$  con  $\alpha = .05$ ,  $t = 6$  e  $\infty$  gl.

## RESULTADOS

En los 95 perros muestreados, se encontró que el número de plaquetas en cinco campos a los 15 seg fue entre 0 y  $680 \times 10^9/L$  con una media de 230, a los 30 seg estuvo entre 0 y  $900 \times 10^9/L$  con una media de 160, a los 60 s entre 0 y  $540 \times 10^9/L$  con una media de 52 y a los 90 s sólo se realizó en cuatro individuos con resultados de 0 en tres de ellos y  $220 \times 10^9/L$  en uno, y finalmente a los 120 segundos sólo hubo un individuo que presentó  $180 \times 10^9/L$  plaquetas. En la gráfica 1 se observa una tendencia a un aumento del conteo plaquetario en perros deficientes del FvW.

El tiempo de sangrado en mucosa oral fue de 14 a 120 segundos con una media de 45 s.

Por otra parte, con base en por ciento de actividad del FvW:Ag de los perros muestreados y con base a lo establecido por la Universidad de Cornell (Cuadro 4), se obtuvieron 79/95 con concentraciones de FvW normales (83.15%), 6/95 sospechosos (6.32%) y 16/95 individuos deficientes (16.84%). Los perros deficientes correspondieron proporcionalmente a 4/5 Doberman (80%), 2/32 Pointer (6.25%), 3/16 Rottweiler (18.75%), 3/10 Collie (30%) y finalmente Fila Brasileiro 6/14 (42.85%) (Gráfica 2).

Los conteos de plaquetas en las gotas de sangre del TSMO a los diferentes segundos se muestran en los cuadros 6 al 11.

En cuanto a estos se muestran en la tabla 1. Prueba de STD.

**Tabla 1.** Tabla de contingencia para la comparación de las dos pruebas

Frecuencia Porcentaje: % renglón % columna	positivo	negativo	Total
si	7 7.37 100.00 43.75	0 0.00 0.00 0.00	7 7.37
no	9 9.47 10.23 56.25	79 83.16 89.77 100.00	88 92.63
Total	16	79	95
	16.84	83.16	100.00

Los resultados del coeficiente de la prueba de Kappa fue de .5640, con un límite inferior de .3201 y uno superior de .8079. Los resultados de la prueba de concordancia entre FvW:Ag y conteo plaquetario en gotas de sangre del TSMO (CP), muestran un coeficiente kappa de 0.56 resultado que de acuerdo con los criterios utilizados en este trabajo indican una moderada concordancia, considerando que se busca determinar si el CP es un buen método de diagnóstico de la EvW el valor del coeficiente kappa es considerado como demasiado bajo para establecer al CP como una buena prueba de campo.

La evaluación de la presencia de diferencias en la prevalencia del factor entre las seis razas de perros consideradas resultó en el rechazo de  $H_0: P_1=P_2=P_3=P_4=P_5=P_6$  dado que el valor del estadístico de prueba ( $\chi^2$  calculada =

23.10) fue superior al valor de las tablas ( $\chi^2$  tabular = 11.07), por lo que fue necesario llevar a cabo la comparación de las seis proporciones con el fin de determinar posibles diferencias entre ellas a nivel poblacional.

El procedimiento de comparación múltiple arrojó los resultados que se presentan en la tabla 2

**Tabla 2.** Resultado de las comparaciones pareadas entre las seis razas de perros

Raza	Resultado*
Doberman Pinscher	a
Collie	a b
Fila Brasileiro	a b
Rottweiler	a b
Pointer Alemán	b
Pastor Alemán	b

Letras iguales no difieren ( $P > .05$ )

Estos resultados permiten establecer una diferencia de la raza Doberman Pinscher con respecto al resto de las razas y una igualdad entre estas, por lo que los hallazgos de este trabajo coinciden con lo reportado en la literatura en cuanto a que la raza Doberman Pinscher presenta una mayor prevalencia (Littlewood JD, 1991; Stokol T, 1993).

## DISCUSIÓN

En este estudio ningún perro tuvo incremento en el TSMO más allá de lo que indica el intervalo de referencia (mayor a 4.2 minutos) (media de tiempo de sangrado en los perros no afectados) para considerarlos sospechosos o deficientes del FvW, este resultado bajo la técnica empleada, indicó que la prueba de TSMO no resultó buena opción diagnóstica de la enfermedad.

Con base en la prevalencia de la EvW por raza, se ha descrito que en los Doberman Pinscher se presenta una prevalencia del 35 al 75% lo que es inferior a los resultados de este trabajo que fue del 80%. Los perros de raza Pointer mostraron una prevalencia del 6.25% lo que demuestra semejanza con un estudio realizado en Suecia donde la enfermedad se presentó en aproximadamente el 5% de la población (Gavazza A, 2012). La raza Rottweiler mostró predisposición a la enfermedad, ya que se observó deficiencia de la actividad del FvW en el 18.75%, que coincide con otros autores (Gavazza, 2012). Contrariamente a lo mencionado en la literatura, en donde la raza Pastor Alemán se considera susceptible, en este trabajo no se encontró deficiente en la actividad del factor. Sorpresivamente, las razas Collie y Fila Brasileiro que no habían sido reportadas en la literatura como deficientes, en este trabajo, se encontró elevada prevalencia de la deficiencia del FvW de 30 y 42.85%, respectivamente.

Por otra parte, consideramos que el conteo de plaquetas en las gotas de sangre a diferentes tiempos podría resultar en una correlación positiva con el TSMO y la presencia de la EvW en las razas Doberman, Fila y Rottweiler pero

no en los demás, tal vez por el mayor número de individuos que mostraron deficiencia. Esto sugiere hacer un estudio, en el futuro, con un número mayor de individuos.

Los resultados que se presentan en la gráfica dos, permiten establecer una diferencia de la raza Doberman Pinscher con respecto al Pointer Alemán y Pastor Alemán y una igualdad entre éstas últimas, por lo que los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado en cuanto a que la raza Doberman Pinscher presenta una mayor prevalencia de enfermedad de von Willebrand (Littlewood JD, 1991; Stokol T, 1993).

De acuerdo a lo observado en el presente estudio, hubo correlación entre el número de plaquetas en las gotas de sangre y del tiempo de sangrado de la mucosa oral razas Doberman Pinscher, Fila Brasileiro y Rottweiler pero no en los demás, tal vez por el número bajo de individuos por raza, por lo que se acepta de manera parcial la hipótesis propuesta.

## CONCLUSIONES

No hubo correlación alguna entre las tres pruebas utilizadas.

Como lo indica la literatura los perros de la raza Doberman Pinscher presentan una alta prevalencia de la enfermedad, en éste estudio fue del 80% a diferencia de lo que reportado que es de 35%.

El TSMO en los perros deficientes no fue mayor que en los perros con la cantidad de antígeno normal, esto posiblemente se deba a que no se utilizó el dispositivo por disparo automático y en su lugar se utilizaron lancetas. El conteo de plaquetas a los diferentes segundos del TSMO en perros deficientes y normales no presentó ninguna diferencia significativa.

La raza Fila Brasileiro no está reportada en la literatura como deficiente. En el presente trabajo ésta raza presenta una prevalencia del 42.85%.

La raza Pointer Alemán ha sido reportada con una prevalencia mayor al 30% de la enfermedad, en el presente estudio se encontró dicha prevalencia en un 6.25%.

En México no hay información acerca de la prevalencia de la Enfermedad de von Willebrand en razas reportadas como deficientes como el Doberman Pinscher, ni en razas no reportadas como el Fila Brasileiro, el presente estudio sirve de precedente para futuras investigaciones sobre la enfermedad, sentando las bases de que sí existe la enfermedad y que hay otras razas susceptibles que aún no se han estudiado en las cuales existe una deficiencia importante del factor de von Willebrand.

## SEGUNDA SECCIÓN ANEXOS

**Tabla 1.** Características de la enfermedad de von Willebrand en diferentes razas de perros.

Tipo EvW	Herencia	Signos Clínicos	Multímeros de alto peso molecular	Multímeros de bajo peso molecular	Frecuencia	Raza
<b>Tipo 1</b>	Autosómica dominante con penetrancia incompleta	Moderados	Normales	Normales	Alta	Doberman Pinscher, Shetland Sheepdog
<b>Tipo 2</b>	Autosómica Dominante (tipos 2 A,B y M) o Recesiva (2N)	Severos	Disminuidos	Disminuidos	Muy baja	Pointer Alemán de pelo largo, de pelo corto y de pelo rizado
<b>Tipo 3</b>	Autosómica recesiva	Severos	Muy bajos o indetectables	Muy bajos o Indetectables	Moderada	Terrier Escocés, Kooiker, Pastor de Shetland

**Tabla 2.** Razas de perros más susceptibles a presentar la enfermedad de von Willebrand y porcentaje de perros portadores en diferentes países.

Raza	Australia	Dinamarca	Italia	RU	EUA	Tipo EvW
<b>Airedale Terrier</b>	•				>15	I
<b>Doberman Pinscher</b>	61		•	58	75	I
<b>Cobrador Dorado</b>	•	18		•	30	III
<b>Lobero Irlandés</b>	58				•	I
<b>Manchester Terrier</b>					>15	I
<b>Pointer Alemán pelo corto</b>					•	II
<b>Pointer Alemán pelo largo</b>					13	II
<b>Pastor Alemán</b>			•	•	•	I
<b>Poodle Toy, Estándar</b>					30	I
<b>Rottweiler</b>					>15	I
<b>Schnauzer Miniatura</b>					>15	I
<b>Pastor de Shetland</b>					35	I, III
<b>Terrier Escocés</b>	23				30	III
<b>Corgi</b>	•			•	43	I
<b>Yorkshire Terrier</b>			•		•	I

(RU) Reino Unido, (EUA) Estados Unidos Americanos, • referido pero frecuencia no determinada. (Modificado de Gopegui RR y Feldman BF 1997).

**Tabla 3.** Diferencias clínicas entre alteraciones de hemostasia primaria y secundaria

<b>Manifestación Clínica</b>	<b>Defectos en hemostasia primaria (plaquetas)</b>	<b>Defectos en hemostasia secundaria (factores de la coagulación)</b>
<b>Inicio de sangrado postraumatismo</b>	Inmediato	Tardío (horas, días)
<b>Localización del sangrado</b>	Superficial (piel, mucosas)	Profundo (articulaciones, músculos, cavidades)
<b>Exploración física</b>	Petequias, equimosis	Hematomas, hemartrosis

**Tabla 4.** Clasificación de EvW en el perro de acuerdo a la concentración de FvW:Ag% según la Universidad de Cornell.

<b>FvW:Ag</b>	<b>Interpretación</b>
70 a 180%	Negativo
50 a 69%	Sospechoso o probable portador
0 a 49%	Deficiente

[HTTPS://AHDC.VET.CORNELL.EDU/SECTS/COAG/CLINICAL/VONWILL/LABDIAG.CFM](https://ahdc.vet.cornell.edu/sects/coag/clinical/vonwille/abdiag.cfm)

**Tabla 5.** Pruebas diagnósticas para la evaluación de antígeno del factor de von Willebrand.

**Ensayos cuantitativos para medir la cantidad de FvW:ag**

- Electroinmunoensayo de Laurell y Rocket
- ELISA

**Ensayos cualitativos para medir la actividad funcional del factor de von Willebrand**

**Adhesión plaquetaria**

- TSMO
- Analizador de la función plaquetaria PFA-100
- Prueba de retención en perlas de vidrio

**Agregación plaquetaria en respuesta a agonistas**

- Botrocetina

**Caracterización del Factor de von Willebrand**

- Análisis multimérico
- Inmunoelectroforesis

**Análisis genéticos**

- VetGen
-

**Tabla 6.** Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Doberman Pinscher

% FVW:Ag	TSMO	Plaquetas (CPTMSO) X10 <sup>9</sup> /L			Plaquetas (CPSP) X10 <sup>9</sup> /L	Estado	Género	Hematocrito L/L	Sólidos totales g/L
	segundos	15	30	60					
16.5	60	120	60	80	189	Deficiente	Macho	0.57	73
14.4	53	440	540		372	Deficiente	Hembra	0.54	70
10.8	57	380	440		380	Deficiente	Hembra	0.56	75
34.7	59	180	260		234	Deficiente	Macho	0.46	71
75.1	30	260	200		193	Normal	Macho	0.51	66

**TSMO:** tiempo de sangrado de la mucosa oral, **CPTSMO:** Conteo plaquetario a diferentes momentos del TSMO. **CPSP:** Conteo plaquetario en sangre periférica.

**Tabla 7.** Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Collie.

% FVW:Ag	TSMO	Plaquetas (CPTMSO) X10 <sup>9</sup> /L			Plaquetas (CPSP) X10 <sup>9</sup> /L	Estado	Género	Hematocrito L/L	Sólidos totales g/L
	segundos	15	30	60					
14.2	64	260	240	280	171	Deficiente	Hembra	0.51	70
16.9	40	320			90	Deficiente	Hembra	0.54	72
39.0	22	280			291	Deficiente	Hembra	0.53	60
75.6	28	320			328	Normal	Hembra	0.57	74
74.3	40	120			397	Normal	Hembra	0.51	66
96.0	14	300			180	Normal	Hembra	0.56	73
96.2	27	100			226	Normal	Hembra	0.49	80
59.9	24	180			210	Sospechoso	Hembra	0.55	78
95.7	18	260			335	Normal	Macho	0.42	64
80.4	52	180	200		269	Normal	Macho	0.58	80

**TSMO:** tiempo de sangrado de la mucosa oral, **CPTSMO:** Conteo plaquetario a diferentes momentos del TSMO. **CPSP:** Conteo plaquetario en sangre periférica.

**Tabla 8.** Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Fila Brasileiro.

% FVW:Ag	TSMO	Plaquetas (CPTMSO) X10 <sup>9</sup> /L				Plaquetas (CPSP) X10 <sup>9</sup> /L	Estado	Género	Hematocrito L/L	Sólidos totales g/L
	segundos	15	30	60	90					
19.8	70	180	240	320		269	Deficiente	Hembra	0.59	65
29.8	30	360	180			348	Deficiente	Macho	0.56	65
34.8	53	280	180	200		248	Deficiente	Macho	0.58	65
37.1	63	340	180	120		177	Deficiente	Macho	0.58	58
117	47	400	80			266	Normal	Macho	0.56	62
63.1	39	480	280	400		272	Sospechoso	Macho	0.37	46
77.1	83	180	140	140		232	Normal	Hembra	0.52	64
77.2	90	200	240	20	0	292	Normal	Hembra	0.49	64
58.7	94	260	80	0	0	420	Sospechoso	Hembra	0.51	66
111	114	240	180	60		360	Normal	Hembra	0.50	62
110	39	400	440			612	Normal	Hembra	0.44	72
61.4	45	140	180			200	Sospechoso	Macho	0.53	70
76.2	36	120	80			367	Normal	Hembra	0.46	61
75.3	20	680				420	Normal	Hembra	0.56	63

**TSMO:** tiempo de sangrado de la mucosa oral, **CPTSMO:** Conteo plaquetario a diferentes momentos del TSMO. **CPSP:** Conteo plaquetario en sangre periférica.

**Tabla 9.** Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Rottweiler.

% FVW:Ag	TSMO	Plaquetas (CPTSMO) X10 <sup>9</sup> /L					Plaquetas (CPSP) X10 <sup>9</sup> /L	Estado	Género	Hematocrito L/L	Sólidos totales g/L
	segundos	15	30	60	90	120					
32.6	45	200	180				360	Deficiente	Hembra	0.51	70
29.3	33	600	320				384	Deficiente	Hembra	0.52	68
33.7	58	340	180	320			169	Deficiente	Macho	0.47	80
97.2	51	220	80				406	Normal	Macho	0.51	70
112	64	280	380	540			468	Normal	Hembra	0.50	64
112	50	300	220				351	Normal	Hembra	0.47	64
119	50	260	340				252	Normal	Hembra	0.50	70
120	30	300	240				452	Normal	Hembra	0.50	80
93	40	160	240				448	Normal	Hembra	0.53	72
118	14						304	Normal	Hembra	0.49	62
94.2	40	100	120				472	Normal	Hembra	0.44	72
147	38	180	180				510	Normal	Macho	0.40	63
143	120	260	160	120	220	180	192	Normal	Macho	0.48	71
139	39	200	280				512	Normal	Macho	0.46	64
96.7	25	200					296	Normal	Macho	0.43	59
70.4	48	560	900				223	Normal	Macho	0.43	60

**TSMO:** tiempo de sangrado de la mucosa oral, **CPTSMO:** Conteo plaquetario a diferentes momentos del TSMO. **CPSP:** Conteo plaquetario en sangre periférica.

**Tabla 10.** Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Pastor Alemán.

% FVW:Ag	TSMO	Plaquetas (CPTSMO) X10 <sup>9</sup> /L			Plaquetas (CPSP) X10 <sup>9</sup> /L	Estado	Género	Hematocrito L/L	Sólidos totales g/L
	segundos	15	30	60					
75.4	36	140	120		327	Normal	Hembra	0.54	63
148	45	340	200		288	Normal	Macho	0.34	64
106	30	520	520		392	Normal	Macho	0.58	66
135	48	280	200	180	492	Normal	Macho	0.49	63
85.4	35	240	200		151	Normal	Hembra	0.56	68
149	22	160			292	Normal	Macho	0.47	58
54.2	30	380	280		214	Sospechoso	Macho	0.54	62
63.4	14	600			489	Sospechoso	Macho	0.44	62
97.8	46	240	180		400	Normal	Hembra	0.49	72
114	38	100	60		225	Normal	Macho	0.61	75
113	42	120	80		285	Normal	Hembra	0.56	63
114	28	140			212	Normal	Hembra	0.60	74
130	59	320	160		274	Normal	Hembra	0.60	73
107	50	180	120		312	Normal	Hembra	0.56	68
94.6	44	220	160		235	Normal	Hembra	0.49	65
121	28	120			443	Normal	Hembra	0.49	55
134	48	120	20		293	Normal	Hembra	0.55	58
107	49	180	180		317	Normal	Hembra	0.53	66

**TSMO:** tiempo de sangrado de la mucosa oral, **CPTSMO:** Conteo plaquetario a diferentes momentos del TSMO. **CPSP:** Conteo plaquetario en sangre periférica.

**Tabla 11.** Resultados de la evaluación hematológica de la EvW por 3 técnicas diferentes en la raza Pointer Alemán

% FVW:Ag	TSMO	Plaquetas (CPTSMO) X10 <sup>9</sup> /L				Plaquetas (CPSP) X10 <sup>9</sup> /L	Estado	Género	Hematocrito L/L	Sólidos totales g/L
	segundos	15	30	60	90					
27.0	86	180	120	80		317	Deficiente	Macho	0.53	70
48.7	42	160	100			511	Deficiente	Hembra	0.52	78
114	77	140	340	200		161	Normal	Macho	0.49	70
108	40	200	240			400	Normal	Hembra	0.49	65
130	54	180	100			123	Normal	Macho	0.48	72
156	30	280	260			173	Normal	Macho	0.48	68
122	30	260	120			307	Normal	Hembra	0.48	64
149	34	160	60			238	Normal	Hembra	0.46	80
91.0	46	160	120			304	Normal	Hembra	0.49	87
106	60	160	140	80		216	Normal	Hembra	0.59	70
151	45	160	40			179	Normal	Macho	0.48	82
118	75	160	700	100		248	Normal	Macho	0.54	70
91.4	23	160				208	Normal	Macho	0.54	80
105	32	140	140			271	Normal	Hembra	0.46	70
91.0	38	100	120			264	Normal	Hembra	0.50	72
146	30	200	60			260	Normal	Hembra	0.43	82
137	90	60	80	80	60	92	Normal	Macho	0.48	74
130	43	120	100			320	Normal	Macho	0.58	78
122	15	140				377	Normal	Hembra	0.53	72
96.0	20	360				408	Normal	Macho	0.51	78
122	64	240	160	60		303	Normal	Hembra	0.54	77
105	22	100				293	Normal	Macho	0.61	82
73.0	60	200	100	160		285	Normal	Macho	0.53	73
146	45	260	160			226	Normal	Hembra	0.50	84
144	45	120	220			194	Normal	Macho	0.51	63
109	55	140	140			244	Normal	Hembra	0.53	72
77.1	37	140	180			240	Normal	Macho	0.55	72
80.3	70	40	60	100		320	Normal	Hembra	0.53	71
144	40	120	100			248	Normal	Macho	0.63	65
98.0	48	140	180			260	Normal	Macho	0.40	67
85.5	44	100	120			354	Normal	Macho	0.53	76
90.7	33	200	160			239	Normal	Macho	0.45	73

**TSMO:** tiempo de sangrado de la mucosa oral, **CPTSMO:** Conteo plaquetario a diferentes momentos del TSMO. **CPSP:** Conteo plaquetario en sangre periférica.

**Tabla 12.** Comparación por raza entre perros normales y deficientes, con base al % de actividad del vWF:Ag

Raza	Muestreados (Ni)	Deficientes (Xi)	Proporción deficientes (P)	Proporción no deficientes (Q)
Pointer Alemán	32	2	0.0625	0.9375
Pastor Alemán	18	0	0	1.0
Rottweiler	16	3	0.1875	0.8125
Fila Brasileiro	14	4	0.2857	0.7143
Collie	10	3	0.30	0.70
Doberman Pinscher	5	4	0.8	0.2
<b>Global</b>	<b>95</b>	<b>16</b>	<b>0.1684</b>	<b>0.8316</b>

**Cuadro 13.** Comparaciones pareadas entre razas

Raza	pi	Ni	Proporciones transformadas	EE 6 vs	q 6 vs:	q 5 vs:	q 4 vs:
<b>6-Doberman</b>	0.8	5	60.32	-	-	-	-
<b>5-Collie</b>	0.30	10	34.28	10.66	2.44=NS	-	-
<b>4-Fila B</b>	0.285 7	14	33.18	10.14	2.67=NS	0.13=NS	-
<b>3-Rottweiler</b>	0.187 5	16	26.93	9.97	3.35=NS	-	8.2=S
<b>1-Pointer A</b>	0.062 5	32	15.9	9.34	4.75=S*	2.56=NS	7.19= S*
<b>2-Pastor A</b>	0	18	6.63	9.03	-	3.53=NS *	7.83= S*

NS= no significativo; s= significativo a nivel de p=0.05

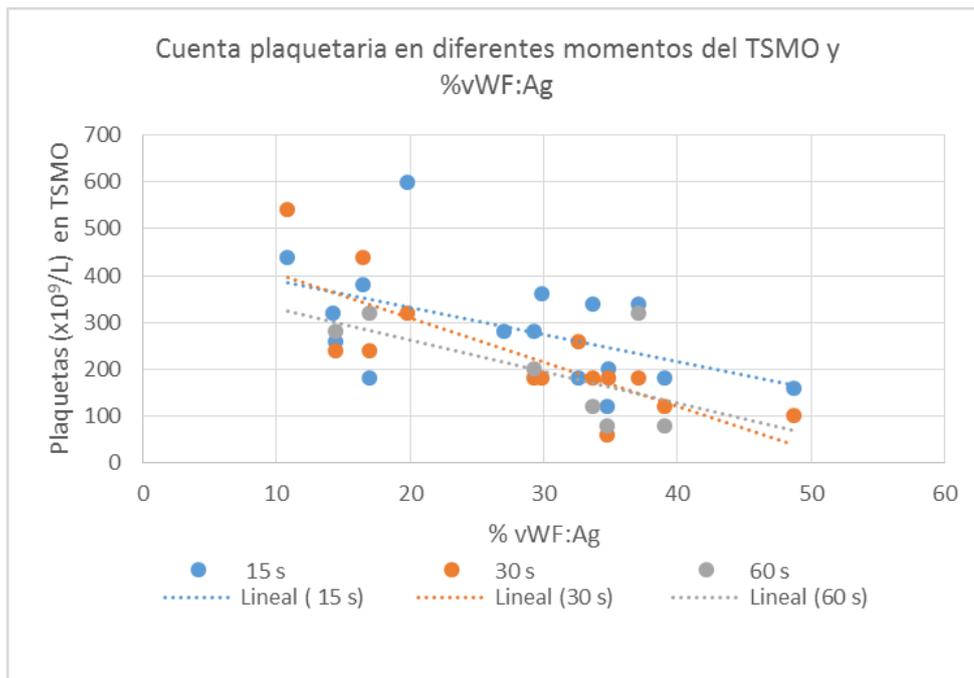
**Tabla 14.** Resultado de las comparaciones pareadas entre las seis razas de perros

Raza	Resultado*
Doberman Pinscher	a
Collie	ab
Fila Brasileiro	ab
Rottweiler	ab
Pointer Alemán	b
Pastor Alemán	b

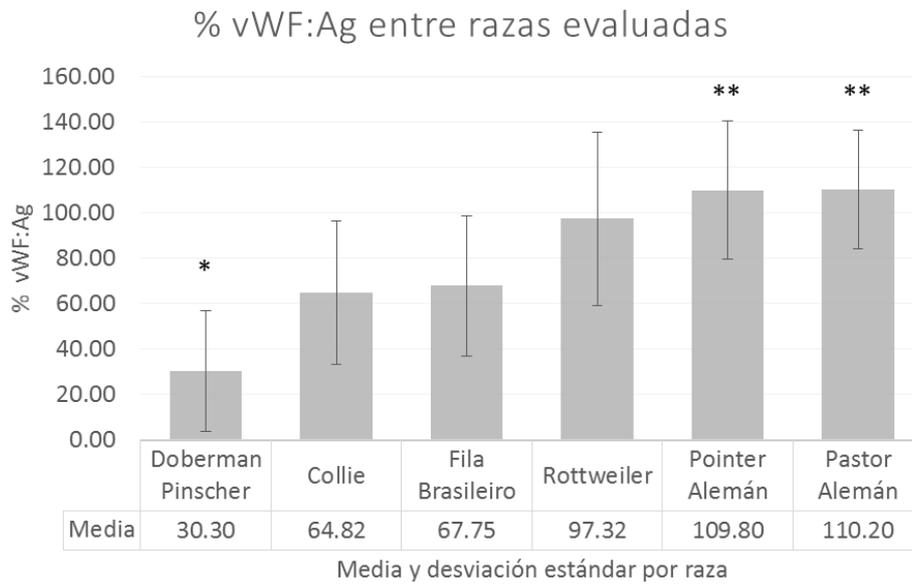
Letras iguales no difieren ( $P > .05$ )

Como es posible notar las razas con las mismas letras tienen proporciones similares por lo que el Doberman Pinscher presenta una proporción diferente al pointer Alemán y al pastor Alemán

**Gráfica 1.** Representación del número de plaquetas en frotis de los diferentes momentos de TSMO en perros deficientes del %vWF:Ag.



**Gráfica 2.** Resultado de las comparaciones pareadas entre las seis razas de perros.



Diferencia estadística significativa del % vWF:Ag entre razas de perros, marcadas con uno y dos asteriscos ( $p < 0.05$ ).

**Figura 1.** Material utilizado en la toma de muestras: Alcohol etílico 96° GL, algodón, jeringa desechable 3 mL c/ aguja 22 G 1½ 1, gasas, tubos con citrato de sodio de 2.5 mL, tubos con EDTA de 0.5 mL, lancetas desechables, portaobjetos, cronómetro, ligadura para toma de muestra.



**Figura 2.** Identificación del sitio para realizar incisiones con lancetas para el TSMO.



**Figura 3.** Realizando el TSMO y los extendidos de sangre de las gotas del mismo.



**Figura 4.** Realización de extendidos de las gotas de sangre del TSMO a diferentes segundos.



**Figura 5.** Coagulómetro de IL Diagnostics ACL PRO 7000 realizando nefelometría de las muestras de los perros en el Instituto Politécnico Nacional de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.



## REFERENCIAS

- Argos Portal Veterinario. Vasculitis cutáneas y sistémicas. 2009. URL Disponible en: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/677/Articulos-archivo/Vasculitis-cutaneas-y-sistemicas.html>
- Avgeris S, Lothrop CD, McDonald TP. Plasma von Willebrand factor concentration and thyroid function in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1990;196(6):921-924.
- Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *J Clin Invest.* 2005;115:3363-3369.
- Bodin S, Soulet C, Tronchère H, Sié P, Gachet C, Plantavid M, Payrastré B. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J Cell Sci.* 2005;118(4):759-769.
- Brooks MB, A Review of Canine Inherited Bleeding Disorder: Biochemical and Molecular Strategies for Disease Characterization and Carrier Detection. The American Genetic Association. 1999;90:112-118.
- Brooks MB, Leith GS, Allen AK, Woods PR, Benson RB, Dodds WJ. Bleeding disorder (von Willebrand disease) in a quarterhorse. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:114-116.
- Brooks MB, Erb HN, Foureman P, Ray K. von Willebrand disease phenotype and von Willebrand factor marker genotype in Doberman Pinscher dogs. *Am J Vet Res* 2001; 62:364-369.
- Brooks M, Dodds WJ, Raymond SL. Epidemiologic features of von Willebrand's disease in Doberman Pinschers, Scottish Terriers, and Shetland Sheepdogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200(8):1123-1127.

Brooks M, Raymond S, Catalfamo J. Severe recessive von Willebrand's disease in German wirehaired pointers. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209:926–929.

Brooks MB, Catalfamo LJ. Von Willebrand Disease. En: Weiss JD, Wardrop JK, editors. *Schalm's Veterinary Hematology.* Iowa: Wiley-Blackwell, 2010: 612-618.

Brooks MB, Catalfamo JL, Brown HA, Ivanova P, Lovaglio J. A hereditary bleeding disorder of dogs caused by a lack of platelet procoagulant activity. *Blood,* 2002;99:7,2434-2441.

Buga CI, Arion C. Up to date concepts about von Willebrand disease and the diagnosis of this hemostatic disorder. *J Med Life.* 2014; 7 (3): 327-334.

Burgess H<sup>1</sup>, Wood D. Validation of a von Willebrand antigen enzyme-linked immunosorbent assay and newly developed collagen-binding assay. *Can J Vet Res.* 2008;72:420-427.

Burgess HJ, Woods JP, Abrams-Ogg AC, Wood RD. Evaluation of laboratory methods to improve characterization of dogs with von Willebrand Disease. *Can J Vet Res.* 2009;73:252-259.

Bustamante CG, Ticona SY. Trombosis-Embolia. *Patología. Revista de Actualización Clínica.* 2014;43:2287-2290. URL Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v43/vol43\\_a09.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v43/vol43_a09.pdf)

Carrillo ER, Salmerón NP, Carvajal RR, Contreras DV, Hernández AC. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva.* 2004; XVIII (1): 17-23.

Cazenave JP, Klein-Soyer C, Beretz A. Thrombogenic properties of the vessel and their inhibition. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1982; 24 (3): 167-71.

Comp PC. Laboratory evaluation of Protein S Status. *Semin Thromb Hemost.* 1990;16:177-81.

De Gopegui RR., Feldman BF. von Willebrand's Disease. *Comparative Haematol Internat.* 1997;7:187-196.

De Meyers SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. Von Willebrand Factor to the Rescue. *Blood.* 2009; 113:5049-5057.

Dodds WJ. Acquired von Willebrand's disease. *Proc Am Anim Hosp Assoc.* 1989; 614-615.

Dodds WJ. Canine von Willebrand's Disease. *J Lab Clin Med.* 1970; 76:713-721.

Dong JF. Cleavage of ultra - large von Willebrand factor by ADAMTS13 under flow conditions. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1710 – 1716.

eClinPath, an online textbook on Veterinary Clinical Pathology. 2015.  
Disponibile en: <http://www.eclinpath.com/hemostasis>

Favaloro EJ. Laboratory identification of von Willebrand disease: technical and scientific perspectives. *Semin Thromb Hemost* 2006;32:456–471.

French TW, Fox LE, Randolph JR *et al.* A bleeding disorder (von Willebrand's Disease) in a Himalayan cat. *J Am Vet Med Assoc.*1987;190:437-439.

Fuster V, Griggs TR. Porcine von Willebrand disease: implications for the pathophysiology of atherosclerosis and thrombosis. *Prog Hemost Thromb.* 1986;8:159-183

Ghosh A, Vo A, Twiss BK, Kretz CA, Jozwiak MA, Montgomery RR, Shavit JA Characterization of Zebrafish vonWillebrand Factor Reveals Conservation of Domain Structure, Multimerization, and Intracellular Storage. *Advances Hematol.* 2012, Article ID 214209, 9 pages, doi:10.1155/2012/214209.

Gui-Ping L, Bing N, Xia Y, Yu-Zhang W. von Willebrand Factor: More Than a Regulator of Hemostasis and Thrombosis. *Acta Hematol.* 2012;128:158-169.

Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol.* 2006;43:S94-100.

Heseltine JC, Panciera DL, Troy GC, *et al.* Effect of levothyroxine administration on hemostatic analytes in Doberman Pinschers with von Willebrand disease. *J Vet Intern Med.* 2005;523-527.

Johnstone IB, Plasma von Willebrand factor-collagen binding activity in normal dogs and in dogs with von Willebrand's disease. *J Vet Diagn Invest* 1999;11:308-313.

James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, *et al.* The mutation Spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *Blood.* 2006;109:145-154.

Jergens AE, Turrentine MA, Kraus KH, Johnson GS. Buccal mucosa bleeding times of healthy dogs and of dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia, and von Willebrand's disease. *American journal of veterinary research*, 1987;48(9):1337-1342.

Johnson GS, Turrentine MA, Kraus KH. Canine von Willebrand's disease: a heterogeneous group of bleeding disorders. *Vet Clin N Am* 1988;18:195–229.

Johnstone IB. Clinical and Laboratory Diagnosis of Bleeding Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1988;18(1):21-33.

Johnstone IB. Inherited defects of hemostasis. *Compend Contin Ed Prac Vet*. 1982;4:483-489.

King SM, Reed GL. Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Develop Biol*. 2002;13:293-302.

Landis J., Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-174.

Lemmerhirt HL, Broman KW, Shavit JA, et al. Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels: quantitative trait loci analysis in a mouse model. *J Thromb Haemost* 2007;5:329–335.

Littlewood JD. Von Willebrand's disease in the dog.. *Vet Annual*. 1991;31:163-172.

Littlewood JD, Herrtage ME, Gorman NT, McGlennon NJ. Von Willebrand's disease in dogs in the United Kingdom. *Vet Rec*. 1987;121:463-468.

Mansell PD, Parry BW. "Changes in factor VIII activity and von Willebrand factor antigen concentration with age in dogs". *British Veterinary Journal*. 1992;148:4:329-337.

Mateo J, Santamarina A, Borrell M, Fontcuberta J. Fisiología y exploración de la hemostasia. En: Sans SJ, Besses RC, Vives JL. Hematología Clínica. Madrid. Harcourt, 2001;597-618.

Mattoso CR, Takahira RK, Beier SL, Araújo JP, Corrente JE. Prevalence of von Willebrand Disease in dogs from Sao Paulo State, Brazil. J Vet Diagn Invest. 2010 22(1):55-60.

McCornnell MF. Revisión de la hemostasia. En: Day MJ, Mackin A, Littlewood JD, editores. Manual de hematología y transfusión en pequeños animales. España: BSAVA, 2012: 231-240.

Menache D, Grossman BJ, Jackson CM. Antithrombin III Physiology, deficiency and replacement therapy. Transfusion. 1992;32:530-88.

Meyers KM, Wardrop KJ, Meinkoth J. Canine von Willebrand's disease: pathobiology, diagnosis and short-term management. Compend Contin Educ Vet Pract. 1992;14:13-22.

Meyers LJ, Pierce KR, Growing GM *et al.* Hemorrhagic diathesis resembling pseudohemofilia in a dog. J Am Vet Med Assoc. 1972;161:1028-1029.

Mischke R. Keidel A. Influence of platelet count, acetylsalicylic acid, von Willebrand's disease, coagulopathies, and haematocrit on results obtained using a platelet function analyzer in dogs. Vet J 2003;165:43-52.

National Institutes of Health. The Diagnosis, Evaluation, and Management of von Willebrand Disease. National Heart Lung and Blood Institute. December 2007.No. 08- 5832. URL Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/vwd.pdf>

Nichols TC, Bellinger DA, Merriks EP, Raymer RA, Kloos MT, DeFreiss N, Ragni MV, Griggs TR. Porcine and Canine vonWillebrand Factor and vonWillebrand Disease: Hemostasis, Thrombosis, and Atherosclerosis Studies. Hindawi Pub Corp Thrombosis 2010, Article ID 461238, doi:10.1155/2010/461238.

Organización Mundial de la Salud. Uso Clínico de la Sangre en Medicina General Obstetricia Pediatría y Neonatología Cirugía y Anestesia Trauma y Quemaduras. 2001:30. URL Disponible en: [http://www.who.int/bloodsafety/clinical\\_use/en/Manual\\_S.pdf](http://www.who.int/bloodsafety/clinical_use/en/Manual_S.pdf)

Pancier DL, Johnson GS. Plasma von Willebrand factor antigen concentration in dogs with hypothyroidism. J Am Med Assoc. 1994;205:1550-1553.

Panteleev MA, Dashkevich NM, Ataullakhanov FI. "Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion." Thrombosis research 2015;136: 699-711.

Páramo JA, Panizo E, Pegenaute C, Lecumberri R. Rev Univ Navarra. 2009;53(1): 19-23.

Patterson MM, Jackson LR , Brooks MB , et al. Type 3 von Willebrand's disease in a Rhesus monkey . Comp Med 2002; 52: 368-371

Rathgeber RA, Brooks M , Bain FT, et al. Von Willebrand disease in a thoroughbred broodmare and foal . J Vet Intern Med. 2001;15(1):63–66.

Raymond SL, Jones DW, Brooks MB, Dodds WJ. Clinical and laboratory features of a severe form of von Willebrand disease in Shetland sheepdogs. J Am Vet Med Assoc. 1990;197:1342-1346.

Rodeghiero F, Castaman G, Toso A. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2005;3:2619–2626.

Rogers CL, Rozanski EA. Von Willebrand Factor Antigen Concentration in Dogs with Sepsis. *J Vet Intern Med* 2010;24:229-230.

Sadler JE. New concepts in von Willebrand disease. *Annu Rev Med* 2005;56:173-91.

Russell KE. Platelet Kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. En: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Schalm's veterinary hematology*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2010:576-585.

Schwarz HP, Dorner F, Mitterer A, *et al.* Evaluation of recombinant von Willebrand Factor in a canine model of von Willebrand disease. *Haemophilia* 1998;4(Suppl. 3):53–62.

Sheskin K. D. *Handbook of parametric and non parametric statistical procedures*. Third edition. CRR Press. 1193 PP

Stockham, Steven L., and Michael A. Scott. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. John Wiley & Sons, 2008.

Stokol T. Enfermedad de von Willebrand. En: Day MJ, Mackin A, Littlewood JD, editores. *Manual de hematología y transfusión en pequeños animales*. España: BSAVA, 2012:317-327.

Stokol T, Parry BW. "Stability of von Willebrand factor and factor VIII in canine cryoprecipitate under various conditions of storage." *Research in veterinary science*. 1995;59:2:152-155.

Sullivan PS, Grubbs ST, Olchowy TW, et al. Bleeding diathesis associated with variant von Willebrand factor in a Simmental calf. J Am Vet Med Assoc. 1994;205:1763-1766.

Sheskin K. D. Handbook of parametric and non parametric statistical procedures. Third edition. CRR Press. 1193 PP

Troy GC. An Overview of Hemostasis. In: Hemostasis. Veterinary Clinics of Nort America: Small Animal Practice. 1998;18(1):5-19.

Venta PJ, Brewer GJ. Mutation causing von Willebrand's disease in Scottish Terriers. J Vet Intern Med 2000;14:10-19.

Viera A.J., Garrett J.M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Fam Med. 2005; 37:360-363.

Villanueva VJ. Orientación Diagnóstica en las Hemorragias. Revista de Posgrado de la Cátedra VIa. 2001;106:1-7. URL Disponible en: [http://med.unne.edu.ar/revista/revista106/orien\\_diag\\_hemorragias.html](http://med.unne.edu.ar/revista/revista106/orien_diag_hemorragias.html)

Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, et al. The platelet activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. Crit Care Med 2002;30:S294–S301