

Artículo Original

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FASES DE LA HEMOSTASIA EN DOS LÍNEAS DE RATAS DE LABORATORIO

COMPARATIVE STUDY OF THE PHASES OF HEMOSTASIS IN TWO LINES OF LABORATORY RATS

NAVAS, LILIBETH¹; VILLASANA, KATIUSCA², LEÓN, WANDA³, MONTERO, YEPSYS⁴, QUIÑONEZ, BELKIS^{2,4}

¹Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

²Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

³Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

⁴Bioterio, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

Recibido: 20/05/2021

Aceptado: 26/06/2021

Publicado: 10/10/2021

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue comparar las fases de la hemostasia, en ratas de laboratorio de las líneas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague-Dawley. Metodología: se utilizaron 10 ratas de cada una de las líneas, producidas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes, con peso corporal comprendido entre 370 y 400 g, se determinó: tiempo de sangría, conteo plaquetario, tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa), tiempo de coagulación y fibrinógeno. Resultados: el tiempo de sangría y el TP fueron significativamente menores en las ratas BIOU: Sprague-Dawley ($p=0,002$ y $p=0,011$ respectivamente). No hubo diferencia significativa en el conteo plaquetario, TPTa, tiempo de coagulación y fibrinógeno entre ambas líneas de ratas ($p>0,05$) Conclusión: se evidenciaron diferencias entre las ratas de laboratorio BIOU: Sprague-Dawley y BIOU: Wistar, tanto en la hemostasia primaria como en la hemostasia secundaria; específicamente el tiempo de sangría y el TP fueron significativamente menores en las ratas BIOU: Sprague-Dawley. Las diferencias halladas podrían explicarse por variaciones en las bases genéticas de cada línea de ratas, que influyen en la función plaquetaria o en la expresión y/o actividad de los factores de coagulación, proteínas anticoagulantes y componentes del sistema fibrinolítico.

Palabras clave: hemostasia; coagulación sanguínea; pruebas de hemostasia; ratas Wistar; ratas Sprague-Dawley.

Cómo citar este artículo:

Navas, L.; Villasana, K.; León, W.; Montero, Y. y Quiñonez, B. (2021). Estudio comparativo de las fases de la hemostasia en dos líneas de ratas de laboratorio. *GICOS*, 6(4), 71-84



La Revista Gicos se distribuye bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial Compartir Igual 3.0 Venezuela, por lo que el envío y la publicación de artículos a la revista es completamente gratuito. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/ve/>

ABSTRACT

The objective of the research was to compare the hemostasis phases in laboratory rats of the BIOU lines: Wistar and BIOU: Sprague-Dawley. Methodology: 10 rats from each of the lines were used, produced by the Bioterio of the University of Los Andes, with body weight between 370 and 400 g, it was determined: bleeding time, platelet count, prothrombin time (PT), partial time of activated thromboplastin (aPTT), clotting time and fibrinogen. Results: bleeding time and PT were significantly lower in BIOU: Sprague-Dawley rats ($p = 0.002$ and $p = 0.011$ respectively). There was no significant difference in platelet count, aPTT, clotting time and fibrinogen between both lines of rats ($p > 0.05$). Conclusion: differences were observed between the BIOU: Sprague-Dawley and BIOU: Wistar laboratory rats, both in the primary hemostasis as in secondary hemostasis; specifically, bleeding time and PT were significantly lower in BIOU: Sprague-Dawley rats. The differences found could be explained by variations in the genetic bases of each line of rats, which influence platelet function or the expression and / or activity of coagulation factors, anticoagulant proteins and components of the fibrinolytic system.

Keywords: hemostasis, blood coagulation, hemostasis test, Wistar rats, Sprague-Dawley rats.

INTRODUCCIÓN

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

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

Los fenómenos trombóticos tienen diverso origen y constituyen unas de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad. La trombosis arterial y venosa es una consecuencia común de procesos infecciosos bacterianos y virales, incluyendo la enfermedad infecciosa COVID-19 causada por el coronavirus SARS-CoV-2, pandemia que ha generado la mayor crisis de salud pública en la actualidad (Beristain-Covarrubias et al., 2019; Sadoughi et al., 2021). Los trastornos de la hemostasia desencadenados específicamente por la infección por SARS-CoV-2 se han denominado coagulopatía asociada a COVID-19 y hoy día son objeto de múltiples investigaciones (Shankar et al., 2021).

La fisiología y fisiopatología de la hemostasia son ampliamente estudiadas, tanto en humanos como en animales de laboratorio. Los modelos animales representan una herramienta invaluable para investigar la patogenia de la formación de trombos y evaluar nuevos tratamientos, con este propósito diversos animales

de laboratorio son utilizados en la investigación básica y farmacéutica para valorar los efectos que producen sobre la hemostasia numerosos medicamentos, alimentos, fitofármacos y compuestos químicos con potencial farmacológico (Tarandovskiy et al., 2020).

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

Las ratas se han utilizado en muchos estudios experimentales que han generado importantes avances en las ciencias biomédicas. Estos animales de laboratorio poseen características valiosas para la investigación, ya que son más tranquilas que los ratones, pueden tolerar el hacinamiento, y sus órganos son de tamaño adecuado para la experimentación. Adicionalmente su anatomía y fisiología es similar a la del humano, lo que permite la extrapolación de los resultados de diferentes estudios (Krinke, 2000). No obstante, la extrapolación de los resultados de los experimentos realizados en roedores hacia el ser humano y otras especies animales, exige la definición detallada de las características genéticas, sanitarias, anatómicas y fisiológicas del animal (Morales, 2015), así como el conocimiento de las diferencias inter e intraespecies, y su importancia para la selección del animal apropiado a los objetivos de cada investigación.

Trabajos previos han reportado que existen diferencias tanto entre líneas de ratones, como de ratas de laboratorio en algunos parámetros hematológicos y hemostáticos. Sudo et al. (2006) observaron diferencias marcadas en la agregación plaquetaria inducida por colágeno y ADP en 13 cepas de ratones consanguíneos *knockout*: 129/Sv, A, AKR, BALB/c, C3H/He, C57BL/6J, CBA, DBA/1, DBA/2, ddY, FVB, ICR, NZW, y la cepa de ratones diabéticos C57BL/KsJ db/db. Posteriormente, Barrios et al. (2009) hallaron diferencias en el recuento plaquetario, los niveles de plasminógeno y el factor XIII, al comparar ratones de las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3H/He. Asimismo, en la investigación publicada por White et al. (2010) se encontraron diferencias en el número de plaquetas y el tiempo de sangría de ratones 129S1/SvImJ, BalbC y C57BL/6J, aunque no hubo diferencia significativa en el tiempo de protrombina (TP) y tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa), entre las tres cepas.

Con relación a las diferencias que existen en la hemostasia entre líneas de ratas de laboratorio, es escasa la información científica disponible, destaca el trabajo publicado por Sudo et al. (2007) quienes demostraron que, en respuesta a la acción de inductores, las ratas Sprague-Dawley y Brown Noruega presentan mayor agregación plaquetaria y formación de trombos que las ratas ACI, Donryu, Fischer 344 (F344), ASE, Wistar y WKAH.

Por otra parte, se han publicado estudios relacionados con diferencias metabólicas entre diversas líneas de animales utilizados en investigación, incluyendo ratas de las líneas Wistar y Sprague-Dawley. En este sentido, Miranda et al. (2018) compararon el metabolismo lipídico de ratas Wistar y Sprague-Dawley con

obesidad inducida por la dieta, y hallaron que las ratas Wistar son más propensas a acumular tejido adiposo. Recientemente, Kisui et al. (2020) reportaron variaciones en la actividad de las hidrolasas (principales enzimas para el metabolismo de fármacos) entre ratas de las líneas Fischer 344, Sprague-Dawley y Wistar, y ratones Balb/c, C3H/He y C57BL/6J.

Las diferencias en la respuesta de ratas Wistar y Sprague-Dawley a la administración de fármacos y tóxicos también ha sido demostrada por autores como Hayakawa et al. (2013) quienes evaluaron la toxicidad crónica de cuatro productos farmacéuticos y adicionalmente determinaron el efecto de restricción de la dieta, evidenciando menor peso corporal y consumo de alimentos en las ratas Wistar Hannover que en las Sprague-Dawley. Asimismo, en las ratas Wistar Hannover el recuento de eritrocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y plaquetas fue menor.

Aun cuando en la investigación sobre la hemostasia se utilizan diferentes especies de animales de experimentación, las ratas de las líneas Wistar y Sprague-Dawley son muy empleadas, ya que reproducen con alta fidelidad los eventos celulares y moleculares de este proceso fisiológico (Brooks et al., 2011). Sin embargo, debido a que la selección del ejemplar biológico es relevante para la interpretación y posible extrapolación de resultados, y se han demostrado diferencias fisiológicas entre líneas y sublíneas de estos animales, en la presente investigación se planteó como objetivo comparar las fases de la hemostasia entre ratas de laboratorio BIOU: Wistar y BIOU: Sprague-Dawley, ambas líneas producidas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes.

METODOLOGÍA

Planteamiento de la investigación: enfoque cuantitativo, tipo comparativo, diseño experimental de laboratorio.

Unidad de investigación: la unidad de investigación está representada por ratas de laboratorio de las líneas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague-Dawley.

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

Sistema de variables: la variable independiente fue las líneas de ratas de experimentación de sus dos categorías línea BIOU: Wistar y línea BIOU: Sprague-Dawley, y las variables dependientes fueron tiempo de coagulación, tiempo de sangría, tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTa), contaje plaquetario y fibrinógeno.

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

Procedimiento de la investigación: se utilizaron 20 ratas, 10 ratas de la línea BIOU: Wistar y 10 ratas de la línea BIOU: Sprague-Dawley, de 4 meses de edad, con peso corporal comprendido entre 370 y 400 g, suministradas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), Mérida, Venezuela. Ambas líneas están clasificadas microbiológicamente como animales convencionales limpios y genéticamente como animales albinos no consanguíneos. El experimento y procesamiento de las muestras se realizó en el BIOULA y en el Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Para proceder a realizar las pruebas de la hemostasia se siguió el siguiente procedimiento:

1. *Inducción de la anestesia:* los animales fueron anestesiados administrando una dosis de 80 mg/kg de ketamina + xilacina 5 mg/kg por vía intraperitoneal.

2. Pruebas de hemostasia

2.1. Tiempo de sangría: el tiempo de sangría se determinó por medio del Método de Duke o método de transección de la cola. El mismo consistió en realizar un corte en la porción distal (a medio centímetro del extremo) de la cola de la rata con un bisturí de hoja N° 11. Luego se secó el sitio de la incisión cada 30 segundos, con papel filtro, hasta que la hemorragia se detuvo. El tiempo transcurrido desde el momento del corte hasta el cese del sangramiento se consideró como el tiempo de sangría.

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

En un tubo de 75x13 se colocaron 20 µl de anticoagulante (EDTA) mas 980 µl de sangre completa, se mezcló la sangre por 1 minuto y se aspiró con la pipeta de Sahil hasta la marca, se limpió muy bien el exterior de la pipeta y se diluyó esta sangre con oxalato de amonio 1% mas 10 µl de sangre con EDTA, de esta manera, se hizo una dilución de la sangre 1:100; se mezcló el contenido del tubo por 2 minutos y utilizando la misma pipeta, se cargaron en la **cámara de Neubauer** del hematímetro, el cual se mantuvo en reposo durante 7 minutos dentro de una cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo se montó el hematímetro en el microscopio, se enfocó con el objetivo de 10x en el cuadrado central, luego se pasó al objetivo de 40x y se contaron todas las plaquetas que se observaron en los 25 cuadros.

Cálculos: # de plaquetas/mm³ = n° de plaquetas contadas x FD x FV

FD: factor dilución 2/0,02 = 100

FV: Factor volumen $1/0,1 = 10$

2.3 Tiempo de protrombina (Método de Quick): en un tubo de eppendorf de 1.5ml para la determinación del tiempo de protrombina, se añadió 100 μ l de citrato de sodio y 900 μ l de sangre, se mezcló y se centrifugó a 2.500 r.p.m durante 10 minutos. El plasma sobrenadante fue trasvasado a otro tubo de ensayo de 13 x 100 mm utilizando una micro pipeta.

Se colocó el plasma en baño de agua a 37° C, durante 2 a 3 minutos. En un tubo limpio y seco, se colocaron 100 μ l del reactivo y se pre incubaron a 37° C durante 2 a 3 minutos. Se pipetearon 50 μ l del plasma pre incubado y se agregaron rápidamente al tubo que contenía los 100 μ l de reactivo de tromboplastina cálcica, activando simultáneamente el cronómetro. El tubo se mantuvo dentro del baño de agua y cerca de una fuente de luz, por 5 a 6 segundos, se sacó e inclinó suavemente, y se detuvo el cronómetro en el momento de aparición de la malla de fibrina. El tiempo transcurrido fue considerado como tiempo de protrombina.

2.4 Tiempo parcial de tromboplastina activado: en tubos de ensayo, se incubó a 37 °C el cloruro de calcio 0.02M y la tromboplastina, durante 3 minutos. Se colocó en un tubo de ensayo 100 μ l de la tromboplastina parcial previamente incubada y se dejó incubar durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agregó 100 μ l del cloruro de calcio 0,02M y se mezcló con el plasma, activando simultáneamente el cronómetro. Al observar la malla de fibrina se detuvo el cronómetro y se anotó el tiempo, en segundos, en que esto ocurrió.

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

2.6 Fibrinógeno: se colocó en un tubo 100 μ l de oxalato de sodio 0,1 M y 900 μ l de sangre. Se invirtió el tubo suavemente utilizando papel sellador. Posteriormente, se centrifugó la sangre oxalatada, por 10 minutos a 2.500 r.p.m. En un tubo se colocó 1ml del reactivo de fibrinógeno y 100 μ l del plasma. Se dejó en reposo durante 4 minutos y se leyó inmediatamente a 510nm usando como blanco solución salina fisiológica con 100uL de plasma oxalatado, en el espectrofotómetro de luz visible Stat Fax.

Aspectos bioéticos: durante el desarrollo de esta investigación se siguieron los fundamentos establecidos por El Código de Ética para la Vida del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias intermedias de la República Bolivariana de Venezuela (2011). En este sentido, se aplicaron los siguientes principios éticos: a) fue utilizada la cantidad mínima de animales necesarios para obtener resultados estadísticamente válidos; b) fueron empleadas las técnicas y herramientas experimentales necesarias para minimizar el sufrimiento de los animales; c) se seleccionaron las líneas de animales apropiadas a los objetivos de la investigación; d) los animales utilizados en este experimento no fueron utilizados en nuevas investigaciones; e) los animales fueron tratados como organismos vivos sensibles durante todo el experimento, evitando o minimizando su

incomodidad, sufrimiento y dolor; f) los autores de la investigación poseían la preparación pertinente para el manejo de animales de laboratorio.

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

RESULTADOS

Tiempo de sangría

En la Tabla 1 se presentan los valores correspondientes a la media aritmética, desviación y error estándar del tiempo de sangría de los dos grupos de estudio.

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

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

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

Contaje plaquetario

Los valores correspondientes a la media aritmética, desviación estándar y error estándar del número de plaquetas obtenido en cada grupo de estudio se muestran en la Tabla 2, obteniendo que los promedios del conteo plaquetario de ambas líneas de ratas incluidas en este estudio son semejantes, sin hallar diferencia estadísticamente significativa al aplicar la prueba estadística t de student para muestras independientes ($p = 0,849$).

Tabla 2. Número de plaquetas en ratas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague-Dawley.

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

Tiempo de protrombina

La media, desviación estándar y error estándar correspondiente al tiempo de protrombina (segundos) obtenido en los grupos de ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague-Dawley se presentan a continuación en la Tabla 3, la prueba de hipótesis para los rangos promedios de los tiempos de protrombina mediante la prueba estadística U de Mann-Whitney determinó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio a un nivel de confianza del 95%, con un valor $p=0,011$.

Tabla 3. Tiempo de protrombina (segundos) en ratas BIOU: Wistar y BIOU: Sprague-Dawley.

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

Tiempo parcial de tromboplastina activado

En la Tabla 4 se presentan los rangos promedio, suma de rangos, media aritmética, desviación y error estándar correspondientes al tiempo parcial de tromboplastina activado hallado en ambos grupos de estudio, debido a que la media aritmética y rango promedio del TPTa del grupo de ratas BIOU:Wistar son mayores que los del grupo de ratas BIOU:Sprague-Dawley. Sin embargo, al aplicar la prueba estadística U de Mann-Whitney, la diferencia entre los rangos no es estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95% ($p = 0,075$).

Tabla 4. Tiempo parcial de tromboplastina activado (segundos) en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague-Dawley .

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

Tiempo de coagulación

Los valores correspondientes a la media aritmética, desviación estándar y error estándar del tiempo de coagulación obtenido en cada grupo de estudio se presentan en la Tabla 5, como se observa, los tiempos de coagulación de ambos grupos son similares, sin hallar diferencia estadísticamente significativa al realizar el contraste de hipótesis mediante la prueba estadística t de Student a un nivel de confianza del 95% ($p= 0,893$).

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

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

Fibrinógeno

En la Tabla 6 se indican los datos correspondientes a la media aritmética, desviación estándar y error estándar del tiempo de coagulación obtenido en los dos grupos de estudio. La comparación de las medias aritméticas

del valor porcentual del fibrinógeno hallado en ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague-Dawley muestra semejanza en los resultados obtenidos en ambos grupos de ratas, por lo que al aplicar la prueba estadística *t* de Student para muestras independientes a un nivel de confianza del 95% la diferencia entre las medias no fue estadísticamente significativa ($p= 0,647$).

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

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

DISCUSIÓN

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

Las ratas de laboratorio de las líneas Wistar y Sprague-Dawley, son ampliamente usadas como modelos animales para estudiar las fases de la hemostasia; sin embargo, debido a que se han demostrado diferencias en algunos procesos fisiológicos entre estos animales, es pertinente comparar su perfil hemostático a fin de seleccionar la más adecuada a los objetivos de una determinada investigación. Con este propósito se compararon las fases de la hemostasia en ratas de laboratorio BIOU: Wistar y BIOU: Sprague-Dawley.

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

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

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

Aun cuando el tiempo de sangría fue significativamente menor en la línea BIOU:Sprague-Dawley, el recuento plaquetario de ambas líneas de estudio fue similar. En contraste, Hayakawa et al. (2013) reportaron en ratas Sprague-Dawley un recuento plaquetario 20% mayor que en las Wistar Han. La semejanza hallada en el recuento plaquetario en la presente investigación sugiere que la diferencia obtenida en el tiempo de sangría no está relacionada con variación en el número de plaquetas de las ratas BIOU:Wistar y BIOU:Sprague-Dawley. Puesto que el tiempo de sangría es fundamentalmente una medida de la integridad de los componentes vascular y plaquetario de la hemostasia primaria (Martinuzzo, 2017), es posible que existan diferencias entre estas líneas de ratas en la función vascular y/o en la adhesión, la activación y la agregación de las plaquetas.

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

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

La evaluación de la hemostasia secundaria estuvo representada por la determinación del TP, TPTa, tiempo de coagulación y del fibrinógeno. En concordancia con el resultado obtenido para el tiempo de sangría, el TP fue

significativamente menor en el grupo de ratas de la línea BIOU: Sprague-Dawley ($p=0,011$). Este resultado es opuesto al reportado por Urushidani et al. (1978), quienes hallaron mayor TP en ratas Sprague-Dawley que en ratas Wistar. Sin embargo, en ese estudio las ratas fueron tratadas con aspirina para inducir úlceras gástricas, la diferencia entre las cepas fue atribuida a mayor sensibilidad de las ratas Sprague-Dawley al efecto de fármacos que actúan sobre la hemostasia. Por el contrario, Cooley et al. (2005) no hallaron diferencia en el TP entre ratas Copenhagen y ratas Lewis PT, aunque en las ratas Copenhagen hubo mayor formación de trombos, por lo que los autores atribuyeron el estado protrombótico de esta línea a la hiperreactividad plaquetaria.

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

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

Aun cuando en la presente investigación el TPTa fue menor en el grupo de ratas de la línea BIOU:Sprague-Dawley, estadísticamente la diferencia entre los promedios de ambos grupos de estudio no fue significativa ($p = 0,075$). Cooley et al. (2005) tampoco hallaron diferencia en el TPTa entre ratas Copenhagen y ratas Lewis. Asimismo, entre las cepas de ratones de laboratorio Jcl:ICR, C3H/HeN, BALB/cA, y C57BL/6J no se demostró diferencia significativa en el TPTa (Ohkura et al., 2007). Igualmente, las cepas de ratones Balb/cJ (BalbC) C57BL/6J (C57) y 129S1/SvImJ (129S) presentaron un TPTa similar (White et al., 2010). Por el contrario, entre las cepas de ratones transgénicos WT y C1q si hubo variación significativa en el TPTa, indicando un incremento de la coagulación en la cepa C1q (Donat et al., 2020).

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

común de la coagulación.

En relación con el fibrinógeno, las dos líneas de ratas objeto de estudio de esta investigación presentaron valores similares; la discusión del resultado obtenido para esta variable con lo reportado en estudios previos está limitada, puesto que en la literatura consultada no se hallaron trabajos en los que se halla comparado el nivel de fibrinógeno entre líneas de ratas de laboratorio. No obstante, en ratones Barrios et al. (2009), tampoco encontraron diferencias significativas en los niveles de fibrinógeno de las cepas C57BL / 6, BALB/c y C3H/HeN; mientras que Hoover-Plow et al. (2006) demostraron que ratones de la cepa A/J poseen mayor cantidad de fibrinógeno que los ratones C57BL / 6J.

CONCLUSIONES

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

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

RECOMENDACIONES

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

REFERENCIAS

- Barrios, M., Rodríguez-Acosta, A., Gil, A., Salazar, A., Taylor, P., Sanchez, E., Arocha-Piñango, C. y Guerrero, B. (2009) Comparative hemostatic Parameters in BALB/c, C 57BL/6 and CH3H/He mice. *Thromb Res*, 124(3), 338-343.
- Beristain-Covarrubias, N., Perez-Toledo, M., Thomas, M., Henderson, I., Watson, S. y Cunningham, A. (2019). Understanding Infection-Induced Thrombosis: Lessons Learned From Animal Models. *Front*

Immunol, 10, 2569.

- Brooks, M., Stokol, T. y Catalfamo, J. (2011). Comparative hemostasis: animal models and new hemostasis tests. *Clin Lab Med*, 31(1), 139-159.
- Donat, C., Kölm, R., Csorba, K., Tuncer, E., Tsakiris, D. y Trendelenburg, M. (2020). Complement C1q Enhances Primary Hemostasis. *Front. Immunol.* 11, 1522.
- González, M. y Parra, O. (2011). *Acción hemostática local del geranio (Pelargonium zonale) sobre la mucosa bucal de ratas Sprague-Dawley*. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Hayakawa, K., Mimura, Y., Tachibana, S., Furuya, M., Kodama, T., Aoki, T., Hosokawa, S., Fukui, M., Shibata, S., Yoshida, M., Masuyama, T., Narita, T., Kuwagata, M., Hisada, S. y Maki, E. (2013). Study for collecting background data on Wistar Hannover [CrI:WI(Han)] rats in general toxicity studies comparative data to Sprague-Dawley rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 38(6), 855-873.
- Hoover-Plow, P., Shchurin, A., Hart, E., Sha, J., Hill, A., Singer, J. y Nadeau, J. (2006). Genetic background determines response to hemostasis and thrombosis. *BMC Blood Disord*, 5(6), 6.
- Kisui, F., Fukami, T., Nakano, M. y Nakajima, M. (2020). Strain and sex differences in drug hydrolase activities in rodent livers. *Eur J Pharm Sci*, 142, 105143.
- Kopić, A., Benamara, K., Schuster, M., Leidenmühler, P., Bauer, A., Glantschnig, H., Höllriegl, W. (2019). Coagulation phenotype of wild-type mice on different genetic backgrounds. *Lab Anim*, 53(1), 43-52.
- Krinke, G. (2000). *The Laboratory Rat*. Academic Press.
- López-Santiago, N. (2016). Pruebas de coagulación. *Acta Pediatr Mex*, 37(4), 241-245.
- Martinuzzo, M. (2017). Pruebas de laboratorio para la evaluación de la hemostasia: fundamentos básicos. *Hematología*, 21(Ext.), 56-68.
- Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias (2011). Código de Ética para la Vida. Caracas: Autor.
- Miranda, J., Eseberri, I., Lasa, A. y Portillo, M. (2018). Lipid metabolism in adipose tissue and liver from diet-induced obese rats: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley strains. *J Physiol Biochem*, 74(4), 655-666.
- Mohammed, B., Monroe, D. y Gailani, D. (2020). Mouse models of hemostasis. *Platelets*, 31(4), 417-422.
- Morales, D. (2015). Bioética de la investigación preclínica en las ciencias biomédicas. *Revista Cubana de Es-tomatología*, 52(4), http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072015000400007
- Mrad, A. (2006). Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos *Revista Colombiana de Bioética*, 1(1), 163-183.
- Ohkura, N., Oishi, K., Sakata, T., Kadota, K., Kasamatsu, M., Fukushima, N., Kurata, A., Tamai, Y., Shirai, H., Atsumi, G., Ishida, N., Matsuda, J. y Horie, S. (2007). Circadian variations in coagulation and fibrinolytic factors among four different strains of mice. *Chronobiol Int.* 24(4), 651-669.
- Páramo, J., Panizo, A., Pegenaute, E. y Lecumberri, R. (2009). Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Revista Médica de la Universidad de Navarra*, 53(1) 19-23.
- Pichler, L. (2008). Parameters of coagulation and fibrinolysis in different animal species a literature based comparison. *Vet. Med. Austria / Wien. Tierärztl. Mschr.* 95, 282 – 295.
- Ramírez, Y. y Ramnarine, R. (2012). *Efecto de la administración combinada de Ginko Biloba y del Ibuprofeno sobre la hemostasia en ratas Sprague-Dawley*. [Trabajo Especial de Grado, Universidad de Los Andes].
- Ruiz-Bedolla, B, López, M, Dionisio-Abrajan, I. (2007). Evaluación del tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial en sangre total. *Rev Mex Patol Clin.* 54(3), 136-143.
- Sadoughi, F., Maleki, P., Hallajzadeh, J., Asemi, Z., Mansournia, M. y Yousefi, B. (2021). Coagulopathy: Another side effect of coronavirus infection, *J Cardiovasc Thorac Res*, 13(1), 15-22.
- Sedano, M. y Florez J. (2014). Farmacología de la hemostasia, la coagulación y la fibrinólisis. En: Flórez, J.

(Dir.) *Farmacología Humana*. Elsevier Masson

- Shankar, A., Varadan, B., Ethiraj, D., Sudarsanam, H., Hakeem, A. y Kalyanasundaram, S. (2021). Systemic arterio-venous thrombosis in COVID-19: A pictorial review. *World J Radiol*, 13(1), 19-28.
- Sudo, T., Ito, H. y Kimura, Y. (2006). Genetic strain differences in platelet aggregation of laboratory mice. *Thromb Haemost.* 95(1), 159-165.
- Sudo, T., Ito, H., Hayashi, H., Nagamura, Y., Toga, K. y Yamada, Y. (2007). Genetic strain differences in platelet aggregation and thrombus formation of laboratory rats. *Thromb Haemost.* 97(4), 665-672.
- Tarandovskiy, I., Shin, H., Baek, J., Karnaukhova, E. y Buehler, P. (2020). Interspecies comparison of simultaneous thrombin and plasmin generation. *Sci Rep*, 10, 3885.
- Urushidani, T., Okabe, S., Takeuchi, K. y Takagi, K. (1978). Strain differences in aspirin-induced gastric ulceration in rats. *Jpn J Pharmacol*, 28(4), 569-578.
- White, T., Pan, S., Witt, T. y Simari, R. (2010). Murine strain differences in hemostasis and thrombosis and tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis Research*, 125(1), 84-89.

Autores

Navas, Lilibeth

Estudiante de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
 Correo-e: lilinavas86@gmail.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0717-2529>

Villasana, Katusca

Profesora Instructor de Bioquímica, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Licenciada en Bioanálisis.
 Miembro activo del Comité de Ética del Bioterio. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
 Correo-e: anastipv@gmail.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6142-1066>

León, Wanda

Profesora Asociado de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Médico Cirujano, PhD en Farmacología.
 Correo-e: wcleond72@gmail.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1347-4171>

Montero, Yepsys

Investigadora en Ciencias Básicas, Naturales y Aplicadas. Bioterio de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Médico Veterinario mención Sanidad Animal.
 Correo-e: yepsysmontero@gmail.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1327-6116>

Quiñonez, Belkis

Profesora Titular de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Directora del Bioterio de la Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. Odontólogo, Magíster Scientiae en Ciencias Médicas Fundamentales.
 Correo-e: belkismq@gmail.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7002-5965>