



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
POSTGRADO DE MEDICINA VETERINARIA



**EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA EN PERROS DE RAZA  
BEAGLE INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON UNA  
CEPA DE *ANAPLASMA PLATYS***

**Lic. MILEDYS A. OVIEDO SOSA**

Tesis doctoral, presentada ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, como  
requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias

Maracay 2011

## **Agradecimientos:**

1. A Dios, por su protección, y por poner en mi camino a tantas personas de buen corazón y con tanta calidad humana.

2. A mi Tutora, mi querida amiga Guadalupe Baldizán, la que nunca me ha abandonado, por su invalorable apoyo y alta dedicación a este trabajo, gracias a ella y a sus dos lindas hijas María Margarita y María Jesús.

*A las siguientes Instituciones participantes y personas que gentilmente colaboraron:*

3. **Opsu** por haberme hecho beneficiaria del Programa de Formación de Doctores Proyecto “Alma Mater”, en especial al Prof. Ernesto Ferrer, Lic. Nayari Gómez y demás personal administrativo.

4. **Cátedra de Bioquímica de la FCV-UCV:** Profesores, Emma Rueda, Lilliam Sivoli, Omar Aguirre, en especial a la Profesora Milagro León, Jefe de la Cátedra de Bioquímica, a M<sup>a</sup> Virginia Castañeda, y a la Sra. Maitrella Pinedo, por todo el apoyo que me han brindado.

5. **Postgrado de Medicina Veterinaria, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Central de Venezuela,** Programa de Doctorado en Ciencias: Profesoras Elizabeth Marcano, Luz E. Camargo, Adriana Méndez y Sras. Olga, Yajaira y Jenilse. A la Dra. Tatiana De Altamirano por sus orientaciones.

6. **Hospital de Pequeños Animales Dr. Daniel Cabello:** A Yasmín Castro y la Lic. Rosiris Henríquez, por su gentileza al contactarme con el MV Alexis Pernía, quien permitió la toma de muestra de sangre, que constituyó el primer aislado de *A. platys* de este trabajo.

7. **Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Parasitología:** en especial a la MV Maria Elena García y a Victoria Ruiz por su valiosa asistencia en la amplificación del aislado original de *A. platys*. A las Profesoras Jessica Quijada y Arlett Pérez Jefe de la Cátedra por su gran apoyo logístico.

8. **Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular:** a la Dra. Ana Zita Fernández, del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, por aceptarme como tesista y dar albergue a mis perros. Por todo el apoyo logístico, asesoramiento científico y por su gran comprensión mostrada.

9. **Laboratorio de Fisiología de Parásitos del CBB-IVIC:** a la Dra. Trina Perrone, a quien conocí por poco tiempo. En vida dirigió dignamente este Laboratorio, a ella y a su extraordinaria tesista Evangelina Sánchez debo la realización del trabajo de Biología Molecular con los Beagles de esta tesis. Que Dios en el cielo cuide de su linda alma.

10. **Laboratorio de Fisiopatología de la Coagulación Sanguínea- Centro de Medicina Experimental, IVIC:** a la Dra. Belsy Guerrero su directora, por haberme permitido trabajar en el recién adquirido Lumiagregómetro y brindarme apoyo logístico. A la Lic. Ana María Salazar por su apoyo.

11. **Laboratorio de Patología Molecular y Celular- CME, IVIC:** al Dr. José Cardier, por su valiosa asistencia en las lecturas en el citómetro de flujo.

12. **Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia:** a la MV. Omaira Parra, por su colaboración en el diagnóstico de IFI de *A. platys* y *E. canis* de los Beagles.
13. **Servicio de Microscopia electrónica del Centro de Microbiología – IVIC:** Tec. Mirtha de Romano, por su asistencia en el procesamiento de las muestras para MET, al Sr. Jorge Rivero del Dpto. de fotografía, por el revelado y escaneo de las micrografías del aislado de *A. platys*.
14. **Laboratorio de Inmunobiología del IDECYT-Universidad Simón Rodríguez.** Dr. Armando Reyna, por su valioso apoyo en el diagnóstico de *A. platys* del aislado amplificado.
15. **Laboratorio de Investigaciones Médicas del Banco Municipal de Sangre. DC.** Lic. Marion Echenagucci, por su gran colaboración en la determinación del FvW:Ag.
16. **Sección de Caninos del Dpto. del Bioterio de la FCV, UCV.** Al MV Héctor Castillo y al Sr. Lara y demás personal, por su apoyo en el cuidado de los perros mestizos.
17. **Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua. a) Lab. de Bioquímica de Ácidos Nucleicos.** Dr. Francisco Triana, quien dirigiera en vida con mucha dedicación y cariño a esta institución (BIOMED), por aceptarme como pasante y orientarme; Prof. Nancy Gutiérrez, por su gentil donación de controles de *E. canis* y asesoramiento **b) Laboratorio de Biología Celular de Eucariotas:** Prof. Heriberto Correia, por su Valiosa colaboración en el análisis de la secuencia de *A. platys*, **c) LARDIDEV:** Prof. Daría Camacho, por su valiosa colaboración en la producción del árbol filogenético.
18. Al Prof. Jorge Flores, del Dpto. de Estadística, de la Facultad de Agronomía, UCV, por sus valiosas orientaciones en el análisis estadístico de los resultados del trabajo.
18. A Raúl Baldizán, y al Sr. Gabriel Quintana, quienes criaron y cuidaron de los cachorros Beagles en Maracay y en el IVIC, respectivamente. Siempre agradeceré su invaluable asistencia.
19. Al Dr. Omar Estrada y a la Dra. Claudia Alvarado por sus orientaciones y apoyo en este trabajo y por la amistad sincera que me brindaron.
20. A mi querida hermana Janeth Oviedo, quien cuidó de mis dos hijas durante mi estadía en el IVIC, gracias a ella y a sus tres hijos.
21. A mi madre, por sus oraciones y colaboración constante en mi tesis y a todos mis hermanos, por su gran apoyo en mis estudios.
22. A todas las personas que no pude nombrar, pero que jugaron un papel de apoyo en esta tesis, mil gracias.
23. Al M.V. Gabriel verde que muy gentilmente me facilitó la obtención de la muestra de uno de sus pacientes caninos (koni), que sirvió como control positivo de anticuerpos antiplaquetas.
24. A los nobles caninos que intervinieron en este trabajo, entregando una parte importante de sus vidas, sin ellos hubiera sido imposible esta investigación, gracias a las personas que los aceptaron como mascotas y les dan calidad de vida en la actualidad.

## Índice General

	página
<b>Resumen</b> .....	xi
<b>Abstract</b> .....	xiii
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	5
<b>Revisión bibliográfica</b> .....	6
<i>Anaplasma platys</i> .....	6
Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina.....	11
Hallazgos hematológicos .....	11
Hallazgos histopatológicos .....	12
Mecanismo fisiológico de la hemostasia.....	12
Hemostasia Primaria.....	12
Hemostasia secundaria: Sistema de la coagulación sanguínea.....	29
Sistema de la Fibrinólisis.....	33
Mecanismo patológico de la hemostasia.....	34
Alteraciones de la hemostasia primaria.....	34
Alteraciones de la hemostasia secundaria.....	42
Alteraciones del sistema fibrinolítico.....	44
Mecanismos hemostáticos en la TCIC y en otras infecciones rickettsiales.....	46
Pruebas de diagnóstico de <i>A. platys</i> .....	48
Evaluación de la hemostasia primaria.....	53
Determinación de IgGAP.....	53
Evaluación de la hemostasia secundaria.....	58
Pruebas para diagnosticar desórdenes del sistema fibrinolítico.....	60
<b>Metodología</b> .....	62
Capítulo I. Obtención del inóculo de <i>A. platys</i> a partir de perros infectados con esta rickettsia.....	62
Obtención del primer aislado de plaquetas con <i>A. platys</i> .....	62
Amplificación del volumen del aislado de <i>A. platys</i> .....	63
Diagnóstico de <i>A. platys</i> en el aislado amplificado de plaquetas.....	63
Capítulo II. Efecto de la inoculación de <i>A. platys</i> Maracay sobre la hemostasia....	66
Unidad Experimental.....	66
Diseño Experimental.....	67
Recolección de la sangre .....	68
Manejo de la muestra .....	68
Fase de preinoculación.....	68

Pruebas de diagnóstico de <i>Anaplasma platys</i> y <i>Ehrlichia canis</i> en los beagles.....	68
Optimización de la técnica de PCR anidada .....	69
Análisis de algunas variables de la hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis.....	70
Fase de postinoculación.....	70
Pruebas de diagnóstico de <i>A. platys</i> y de <i>E. canis</i> en los beagles.....	70
Secuenciación del ADNr 16S de <i>Anaplasma platys</i> .....	73
Comparación de la secuencia del ADNr 16S de <i>A. platys</i> Maracay con las secuencias publicadas en el Banco de Genes .....	73
Análisis filogenético del aislado de <i>A. platys</i> Maracay (Aragua).....	73
Estudio de algunas variables hematológicas.....	74
Estudio de algunas variables de la Hemostasia Primaria.....	75
Estudio de algunas variables de la Hemostasia Secundaria.....	78
Evaluación de algunas variables de la Fibrinólisis.....	79
Detección de la presencia de anticuerpos antiplaquetas.....	79
Análisis estadístico.....	82
<b>Resultados</b> .....	83
Capítulo I. Obtención del inóculo de <i>A. platys</i> a partir de perros infectados con esta rickettsia.....	83
Análisis sanguíneo y clínico de los perros de donde se obtuvo el inóculo de <i>A. platys</i> Maracay.....	83
Análisis del aislado amplificado de <i>A. platys</i> obtenido en Maracay (Aragua) utilizado en la inoculación de los Beagles.....	83
Capítulo II. Efecto de la inoculación de <i>A. platys</i> Maracay sobre la hemostasia en seis Beagles.....	90
Fase de preinoculación.....	90
Diagnóstico de <i>A. platys</i> y de <i>E.canis</i> en los Beagles.....	90
Optimización de la técnica de PCR anidada .....	90
Análisis de algunas variables de la hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis.....	94
Fase de postinoculación.....	94
Diagnóstico de <i>A. platys</i> y de <i>E.canis</i> en los Beagles infectados experimentalmente con <i>A. platys</i> Maracay .....	94
Secuenciación del ADNr 16S de <i>Anaplasma platys</i> .....	98
Análisis filogenético del aislado de <i>A. platys</i> Maracay (Aragua).....	98
Efecto de la inoculación de <i>A. platys</i> Maracay.....	98
Patogénesis de la infección por <i>A. platys</i> Maracay.....	98

Variables indicadoras de la infección aguda por <i>A. platys</i> Maracay: hematocrito, recuento de plaquetas y temperatura corporal .....	103
Evaluación morfológica de las células en los frotis sanguíneos de los Beagles.....	107
Efecto de <i>A. platys</i> Maracay sobre algunas variables hematológicas.....	107
Efecto de <i>A. platys</i> Maracay sobre algunas variables de la hemostasia primaria .....	109
Efecto de <i>A. platys</i> Maracay sobre algunas variables de la hemostasia secundaria...	114
Efecto de <i>A. platys</i> Maracay sobre la fibrinólisis.....	114
Efecto de <i>A. platys</i> Maracay sobre los niveles séricos de anticuerpos IgG asociados a plaquetas ( IgGAP) .....	114
<b>Discusión de resultados</b> .....	121
Capítulo I Obtención del inóculo de <i>A. platys</i> Maracay a partir de perros infectados con esta rickettsia .....	121
Características del inóculo.....	121
Capítulo II. Efecto de la inoculación de <i>A. platys</i> Maracay sobre la hemostasia....	123
Fase de preinoculación.....	123
Diagnóstico de <i>A. platys</i> en los Beagles estudiados .....	123
Variables hematológicas, hemostáticas y de la fibrinólisis.....	123
Fase de postinoculación.....	126
Diagnóstico de <i>A. platys</i> en los Beagles estudiados .....	126
Patogenia de la infección experimental con <i>A. platys</i> .....	128
Efecto de la inoculación experimental de <i>A. platys</i> sobre la hematología.....	130
Efecto de la inoculación experimental de <i>A. platys</i> sobre la hemostasia primaria y los anticuerpos antiplaquetas.....	132
Efecto de la inoculación experimental de <i>A. platys</i> sobre la hemostasia secundaria.	141
Efecto de la inoculación experimental de <i>A. platys</i> sobre la fibrinólisis.....	144
<b>Conclusiones</b> .....	147
<b>Bibliografía</b> .....	149
<b>Anexo 1.</b> Resultados de la secuenciación del ADNr 16S de <i>A. platys</i> Maracay aislado de la sangre de un perro Beagle infectado experimentalmente con la cepa <i>A. platys</i> Maracay	185
<b>Anexo 2.</b> Comparación de la secuencia parcial del gen ARNr 16S de <i>A. platys</i> Maracay con las secuencias parciales del gen ARNr 16S de <i>A. platys</i> Venezuela y <i>A. platys</i> Lara.	190

## Índice de Figuras

Nº	Título	Página
1	Reorganización taxonómica del orden <i>Rickettsiales</i> .....	09
2	Micrografía electrónica de plaquetas en reposo y activadas.....	16
3	Visión general de la hemostasia.....	22
4	Cascada de la coagulación.....	31
5	Micrografías electrónicas de plaquetas de un perro infectado experimentalmente con un aislado de <i>A.platys</i> Maracay (Aragua) .....	87
6	Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos después de la amplificación de tres concentraciones distintas de un fragmento de ADN, específico de la especie <i>A. platys</i> .....	88
7	Optimización de la temperatura de hibridación de los productos de PCR en gel de agarosa.....	92
8	Sensibilidad del PCR anidado .....	93
9	Micrografía del frotis de capa blanca de la sangre de un perro Beagle infectado experimentalmente con <i>A. platys</i> Maracay.....	95
10	Electroforesis en Gel de agarosa de los productos del PCR-anidado de <i>A. platys</i> Maracay amplificado del ADN.....	96
11	Electroforesis en Gel de agarosa de los Productos del PCR-anidado de <i>Ehrlichia canis</i> .....	97
12	Árbol filogenético basado en el ADNr 16S de <i>A. platys</i> Maracay .....	100
13	Curso de la infección con <i>A. platys</i> Maracay .....	101
14	Efecto de la inoculación del aislado de <i>A. platys</i> Maracay (Aragua)	

	sobre el hematocrito de seis Beagles.....	104
15	Efecto de la inoculación del aislado de <i>A. platys</i> Maracay sobre el recuento plaquetario de seis Beagles .....	105
16	Efecto de la inoculación del aislado de <i>A. platys</i> Maracay sobre la temperatura de seis Beagles .....	106
17	Relación entre el recuento plaquetario y la agregación plaquetaria en Beagles infectados experimentalmente por <i>A. platys</i> Maracay .....	112
18	Histogramas de controles de sueros positivos y sueros negativos a IgGAP .....	118
19	Histogramas de tres perros infectados experimentalmente con <i>A. platys</i> Maracay con alto porcentaje de IgGAP .....	119
20	Efecto de la inoculación del aislado de <i>A. platys</i> Maracay sobre los niveles de IgGAP .....	120



## Índice de Tablas

Nº	Título	página
I	Valores de referencia de la hematología y de la coagulación sanguínea en caninos .....	35
II	Cebadores utilizados en el ensayo de PCR para amplificar el gen del ARNr 16S de los organismos <i>E. canis</i> y <i>A. platys</i> .....	72
III	Análisis sanguíneo, coprológico y clínico realizados en el Hospital Daniel Cabello de la FCV, UCV, a la perra pastor alemán de tres meses de edad, de donde se obtuvo el aislado de <i>A. platys</i> utilizado para inducir la infección en los seis Beagles en el presente trabajo .....	84
IV	Observaciones hematológicas y clínicas del perro mestizo infectado experimentalmente con <i>A. platys</i> , que llegó a alcanzar un 99% de parasitemia .....	85
V	Resultados del diagnóstico de <i>A. platys</i> y <i>E. canis</i> en los dos aislados obtenidos en Maracay (Aragua), analizados por observación morfológica con microscopio de luz (FCB), por MET y PCR .....	89
VI	Resultados del diagnóstico de <i>A. platys</i> y <i>E. canis</i> en seis Beagles de un año de edad, previo a la inoculación con un aislado de <i>A. platys</i> obtenido en Maracay (Aragua), analizados por observación morfológica con microscopio de luz (FCB), por (IFI) y PCR .....	91
VII	Comparación de la secuencia de ARNr 16S de la cepa <i>A. platys</i> Maracay con las secuencias de <i>A. platys</i> Venezuela y <i>A. platys</i> Lara.....	99
VIII	Categorización del curso de la infección experimental provocada con un aislado de <i>A. platys</i> Maracay.....	102
IX	Efecto de la inoculación experimental de un aislado de <i>A. platys</i> Maracay sobre algunas variables hematológicas en seis perros Beagles.....	108

X	Efecto de la inoculación experimental de un aislado de <i>A. platys</i> , Maracay sobre el recuento de plaquetas y la función plaquetaria en Beagles.....	110
XI	Efecto de la inoculación experimental con <i>A. platys</i> , Maracay sobre la concentración de fibrinógeno, el tiempo de protrombina(PT),el tiempo de tromboplastina parcial activada (PTTa), el factor von Willebrand (FvWAg) y el factor XIII en Beagles.....	113
XII	Efecto de la inoculación experimental con <i>A. platys</i> , Maracay sobre la algunas variables de la fibrinólisis (dímeroD y tiempo de lisis del coágulo de euglobulina) en Beagles.....	115
XIII	Porcentajes de plaquetas con IgG (determinados por citometría de flujo) y recuento de plaquetario de seis Beagles antes y después de la inoculación con <i>A. platys</i> Maracay.....	117

## RESUMEN

Se condujo un estudio para evaluar, durante un mes, el efecto de la infección experimental con *Anaplasma platys* Maracay sobre la hemostasia primaria (agregación plaquetaria (AP), secreción plaquetaria (SP), Factor von Willebrand (FvWAg), hemostasia secundaria (TP, TTPa, concentración de fibrinógeno (CF), Factor XIII), fibrinólisis (dímero D, tiempo de lisis de euglobulina (TLE)), presencia de anticuerpos anti-plaquetas (IgGAP) y la hematología (plaquetas, hemoglobina, hematocrito, leucocitos, fórmula leucocitaria) en seis perros Beagles sanos, de 1 año de edad. El inóculo se preparó, en una primera instancia, a partir de la sangre de una cachorra pastor alemán, infectada naturalmente con *A. platys*, con 15% de bacteriemia, diagnosticada por observación directa de la bacteria en el frotis de capa blanca (FCB) teñidos con Giemsa, mediante microscopía de luz y consistió de un plasma rico en plaquetas infectadas (PRP). Con el fin de amplificar y probar la eficacia de este aislado, éste fue inoculado en tres perros mestizos, alcanzando 99% de infección única con *A. platys* en uno de ellos e infección moderada (30 y 5%) en los otros dos. El PRP (30 mL) obtenido del perro con 99% de bacteriemia constituyó el inóculo utilizado en los Beagles y contenía 143.000 plaquetas/ $\mu$ L, de las cuales 90 % presentaban inclusiones compatibles con *A. platys*, observadas por FCB y por evaluación de la ultraestructura de la bacteria con microscopía electrónica de transmisión (MET). Todos los Beagles fueron diagnosticados por FCB, serología (IFI) y por PCR, como negativos a *A. platys* y a *E. canis*, previo a la inoculación con el aislado. El experimento consistió en evaluar antes y después de la inoculación del aislado de *A. platys* Maracay, las variables hemostáticas, hematológicas y serológicas antes mencionadas. Cada perro fue su propio control (pre y postinoculación). Se realizó un seguimiento diario de la infección mediante la observación del FCB, medición del recuento de plaquetas, hematocrito y temperatura rectal. Todos los Beagles resultaron *A. platys* (+) y *E. canis* (-) post inoculación. Se estudió la secuencia parcial del ADNr 16S de *A. platys* de la muestra de ADN aislada del PRP de uno de los perros infectados, comprobándose la alta similitud con varias cepas de *A. platys* registradas en el Banco de Genes, evidenciándose también su cercanía a *A. platys* Venezuela (AF287153). La bacteriemia en los Beagles fue cíclica, con un periodo de incubación promedio de 8 días. Hubo tres picos de bacteriemia en el mes de observación en 4 de los perros y dos picos en los restantes. Estos picos se repitieron cada 10 días aproximadamente, siendo el 1<sup>er</sup> pico (26%) considerablemente mayor al segundo (5%) y tercero (8%). La temperatura corporal se elevó en todos los picos, llegando solo en algunos casos

a evidenciarse fiebre. Los Beagles presentaron decaimiento e inapetencia en los picos de infección, pero no pudo ser observada la presencia de petequias ni de hemorragias. El recuento de plaquetas disminuyó significativamente en los tres picos de bacteriemia, desarrollándose una trombocitopenia cíclica, que llegó a ser severa (hasta 1.000 plaquetas/ $\mu$ L), cuya causa aparentemente fue multifactorial. Cada pico fue seguido de un periodo de recuperación, con valores normales de plaquetas e inclusive con trombocitosis en algunos de los perros. También pudo ser observada la presencia de macroplaquetas en la fase aguda de la infección, principalmente en el primer pico de bacteriemia. Se desarrolló una anemia normocítica normocrómica significativa y una disminución no significativa de los leucocitos en todos los picos de bacteriemia. La inoculación con *A. platys* disminuyó la AP y la SP de ATP, de las plaquetas inducidas con colágeno, en los dos primeros picos de infección, así como la SP de ATP inducida con trombina. En cambio la SP de ATP expresada a  $10^{11}$  plaquetas, e inducida con ambos agonistas, no fue afectada por la infección, por lo que aparentemente hay una contribución de la trombocitopenia a la disminución de la función plaquetaria. No pudo observarse efecto de *A. platys* sobre los niveles plasmáticos del FvW-Ag ni sobre los TLE, por lo que pareciera que no hubo daño endotelial. La infección tampoco afectó a los tiempos de coagulación TP y TTPa, ni a la presencia del FXIII. En cambio si fue incrementada significativamente la CF en todos los picos de infección, comportándose como un reactante de fase aguda. La infección no provocó hiperfibrinólisis, ya que el dímero D y el TLE no fueron afectados. Aparentemente tampoco se desarrolló una coagulación intravascular diseminada (CID). No se detectó un incremento de IgGAP en el primer episodio de infección (27% de bacteriemia), con trombocitopenia severa, pareciendo que ésta se debiera al daño directo ocasionado por la bacteria sobre la plaqueta. Los Beagles 1, 2, 5 y 6 elevaron IgGAP de 9, 16, 10 y 16% a 50, 85, 31 y 90% respectivamente, en la 4ª semana postinfección, con una disminución no trombocitopénica de los recuentos plaquetarios a excepción del perro 6 que manifestó trombocitopenia severa. Se concluye que la infección por *A. platys* produjo una disfunción plaquetaria adquirida, en parte debida a la dramática disminución del recuento plaquetario, por otra parte, la presencia de anticuerpos antiplaquetas detectados en el suero de algunos animales enfermos, con recuentos plaquetarios disminuidos apoyan la idea de un mecanismo inmunopatogénico para la trombocitopenia, no afectándose, por otra parte, las variables estudiadas de la hemostasia secundaria ni de la fibrinólisis.

**Palabras claves:** infección experimental, *Anaplasma. platys*, caninos, coagulación sanguínea, anticuerpos antiplaquetas, fibrinólisis, hematología

## **EVALUATION OF HEMOSTASIS IN BEAGLE DOGS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH A STRAIN OF ANAPLASMA PLATYS**

A one-month study was conducted to assess the effect of experimental infection with *Anaplasma platys* Maracay on primary hemostasis (platelet aggregation (PA), fibrinolysis, platelet secretion (PS), von Willebrand Factor antigen (vWFAg), secondary hemostasis (PT, aPTT, Fibrinogen concentration (FC), Factor XIII); (Dimer D, euglobulin lysis time (ELT), presence of antiplatelets antibodies (IgGAP), and hematology (platelets count, hemoglobin, hematocrit, leukocytes count, differential white cells count). A total of six healthy Beagle dogs of one year of age were used. The inoculum (I) prepared in first instance, was obtained from a German shepherd puppy, naturally infected with *A. platys*, with 15% of bacteremia, diagnosed by direct observation of the bacteria in buffy coat blood smear (BCS), stained with Giemsa, under light microscopy. The I consisted of plasma enriched with infected platelets (PEIP). In order to amplify and test the effectiveness of this I, this was inoculated in three mix bred dogs. One dog reached 99% of bacteremia, the other two, reached 30 and 5%, respectively. The PEIP obtained from the dog with highest bacteremia became the I used in experimental dogs, and contained 143,000 platelets/ $\mu$ L, from which 90% showed inclusions compatible with *A. platys*, observed with BCS, and through evaluation of the observation of the ultramicroscopic structure of the bacterium, using transmission electronic microscopy (TEM). Previous to inoculation, all experimental animals resulted negative to *A. platys* and *E. canis* with BCS, serology (IFA) and PCR. The aforementioned hematological variables were assessed before and after inoculation of *A. platys* Maracay. Each dog became its own control (before and after infection). A daily follow-up of infection was done by direct observation of BCS, platelets count, hematocrit, and rectal temperature (RT). After infection, all dogs were positive to *A. platys* and negative *E. canis*. The partial sequence of DNAr 16S of *A. platys*, isolated from the PEIP of one of the infected dogs, was studied. At the same time, a high similarity of this sequence with various strains of *A. platys* deposited in the GeneBank, was found. A high phylogenetic relationship with *A. platys* Venezuela (AF287153) was also seen. Beagles bacteremia was cyclic, with an incubation period of 8 days. During the month of observation there were 3 peaks of bacteremia in 4 dogs, and 2 peaks in the rest. These peaks were repeated every 10 days, with the first peak considerably higher (26%) than the second (5%), and the third (8%), respectively. The RT raised in all peaks, resulting in fever in few cases. Animals showed weakness and lack of appetite in infection peaks, but presence of petechiae or hemorrhage was not evidenced. Platelet count significantly diminished ( $P < 0,05$ ) in all 3 peaks, developing a severe cyclic thrombocytopenia (up to 1,000 platelets/ $\mu$ L), with an apparent multifactor origin. Each peak was followed by a recovery period, with normal values, and even with thrombocytosis in some dogs. Presence of macroplatelets could be observed during the acute infection phase, mainly in the first peak of bacteremia. It was developed significant normocytic normochromic anemia and a non-significant decrease of white blood cells in all the peaks of bacteremia. The inoculation of *A. platys* reduced both, the collagen-induced PA and the collagen-induced and thrombin-induced ATP PS during

the first infection peaks. In contrast, when ATP PS was normalized as  $10^{11}$  platelets, then the PS induced by both agonists was not affected by the infection. Therefore, it is possible that the thrombocytopenia contributed to the reduction of platelet function. The infection did not induce endothelial injury because the plasmatic concentration FvW-Ag and ELT were not modified. The infection neither affected the coagulation times (PT and aPTT) nor the presence of FXIII. On the other hand, there was a significant increase of FC during all the infection peaks, behaving as a classical acute phase protein. The infection did not induce hyperfibrinolysis because the D dimer concentration and ELT were not modified. Apparently, there were no evidence of disseminated intravascular coagulation (DIC). Although there were 27% bacteremia and severe thrombocytopenia throughout the first episode of infection, there was no increase of serum IgGAP. It is likely that the thrombocytopenia was caused by a direct damage of the bacteria to the platelet. There was a rise in the percentage of IgGAP in beagles 1 (9 to 50%), 2 (16 to 85%), 5 (10 to 31%) and 6 (16 to 90%) during the fourth week after infection. Simultaneously, there was also a reduction of the platelet count without reaching a thrombocytopenic threshold; however, beagle number 6 displayed a severe thrombocytopenia. In conclusion, the *A. platys* infection induced a platelet acquire dysfunction partially due to the dramatic reduction in platelet count. Additionally, the presence of antibodies against platelets detected in some of the infected-beagles, along with reduced platelet count, supports the hypothesis of an immunopathogenic mechanism behind the thrombocytopenia, without affecting the secondary hemostasis and fibrinolysis studied variables.

**Key words:** experimental infection, *Anaplasma platys*, canine, blood coagulation, antiplatelet antibodies, fibrinolysis, hematology.

## INTRODUCCIÓN

*Anaplasma platys* es un microorganismo rickettsial intracelular obligatorio, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae* y al género *Anaplasma*. Estos microorganismos infectan *in vivo* específicamente a las plaquetas de caninos, pudiendo ser observados en su citoplasma como inclusiones (mórulas) en los frotis de sangre periférica o en extendidos de capa blanca teñidos con colorantes tipo Romanowsky.

Esta rickettsia ha sido detectada a nivel mundial (1, 21, 44, 50, 54, 95, 130, 168, 209, 252, 298). Casos de infección de caninos por *A. platys* han sido reportados en Venezuela por Arraga (9, 12) Arraga *et al.* (10, 14) y Huang *et al.* (138).

La enfermedad ocasionada por *A. platys* es llamada Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC), fue descrita inicialmente por Harvey *et al.* (130) en Estados Unidos y recibe este nombre debido a que se producen episodios trombocitopénicos, que se repiten en intervalos de 7 a 14 días, coincidiendo con la bacteriemia, que se presenta también cíclicamente (9, 10, 18, 19, 130, 131). Esta trombocitopenia es aparentemente de tipo regenerativa, debido a la hiperplasia megacariocítica encontrada en la médula ósea en perros infectados experimentalmente con *A. platys* (101).

Las plaquetas desempeñan un papel decisivo en detener de manera eficiente a las hemorragias, constituyendo el trombo plaquetario, el cual proporciona la hemostasia primaria o provisional. Estas pueden ser alteradas cuantitativamente (número) y/o cualitativamente (función) produciendo diátesis hemorrágica.

La trombocitopenia con un número de plaquetas menor a 100.000 plaquetas/ $\mu$ L en sangre total es la causa más común de sangramiento. A su vez, los mecanismos que desencadenan esta trombocitopenia pueden deberse a disminución de la producción de plaquetas, aumento de su destrucción o el cúmulo de una fracción de plaquetas mayor de lo normal en el bazo (107).

Probablemente, una de las causas de la trombocitopenia producida por *A. platys* es la infección de las plaquetas por la bacteria, lo cual traería como consecuencia un daño directo a estas células por la replicación de las bacterias (130).

La deposición y activación de las plaquetas sobre la superficie dañada del endotelio, como consecuencia de un daño vascular, podría ser uno de los mecanismos causantes de la trombocitopenia en algunas infecciones rickettsiales, como en perros con fiebre moteada de las Montañas Rocosas (FMMR), cuyo agente causal es la *Rickettsia rickettsii* (86, 270) y con fiebre moteada del Mediterráneo (FMM) con *Rickettsia conorii* como agente causal (86). De acuerdo a estudios realizados por Baker *et al.* (18) en perros infectados experimentalmente con *A. platys*, esta rickettsia, aparentemente, no causa lesiones vasculares significativas, ni vasculítis. Ésto, aunado a la naturaleza cíclica de la trombocitopenia, característica de la infección por *A. platys*, hace poco probable que el daño vascular tenga alguna contribución en el mecanismo de la trombocitopenia.

Otras causas de trombocitopenia han sido demostradas en diferentes infecciones rickettsiales, se ha observado supresión de la producción plaquetaria en la médula ósea en infección con *Ehrlichia canis*, otra rickettsia de la familia *Anaplasmataceae* que infecta al perro con alta frecuencia, principalmente en la fase crónica (319). Por otra parte, se ha demostrado la presencia de anticuerpos antiplaquetarios en el suero de los perros infectados experimentalmente con *E. canis* (127, 305, 306), en anaplasmosis granulocítica humana (316), en perros con fiebre moteada de las Montañas Rocosas (FMMR) (119) y en anaplasmosis granulocítica canina por *A. phagocytophilum* (26).

Se sabe que los anticuerpos anti-*A. platys* aparecen en el suero dos a tres semanas después de la infección experimental (96), pero se desconoce la relación de la respuesta inmunitaria del hospedador con el desarrollo de la trombocitopenia en perros infectados con *A. platys*. 36

También se puede producir trombocitopenia a causa de las hemorragias. Baker *et al.* (18) reportaron hemorragias en tejido linfoide periarteriolar esplénico en perros infectados con *A. platys*, a los 14 días post inoculación, que según los autores fueron similares a las reportadas en perros infectados con *E. canis* (240). Estas hemorragias se correspondieron con el episodio de trombocitopenia inicial, persistieron y fueron visualizadas independientemente de la concentración en sangre de las plaquetas, por lo que pareciera que no estuvieran relacionadas con el comportamiento cíclico del número de plaquetas. Sin embargo, podría ser que estas hemorragias en el bazo fueran un lugar



de utilización de plaquetas, ya que después de la trombocitopenia inicial, el número de plaquetas nunca retornó al valor obtenido antes de la inoculación con *A. platys* (18).

Por otra parte, las plaquetas también pueden estar alteradas en su función. Las infecciones por *E. canis* o por *A. platys* afectan a la hemostasia, observándose un tiempo de sangría prolongado, ocasionado más por mal funcionamiento de las plaquetas que por la trombocitopenia (318).

Gaunt *et al.* (101) reportaron en perros infectados experimentalmente con *A. platys* disminución de la agregación plaquetaria inducida con ADP, aunque la respuesta al colágeno no fue alterada. La relevancia de esta disminución en la función plaquetaria aún no está clara, se ha especulado que se deba a una activación plaquetaria reversible, dando lugar a plaquetas parcialmente degranuladas, las cuales son hemostáticamente hipofuncionales (“plaquetas exhaustas”) (101, 223).

En cuanto al efecto de *E. canis*, se ha reportado disminución de la liberación del factor plaquetario 3 (FP3) (232), inhibición de la migración de las plaquetas (157) y disminución de la retención media plaquetaria (192).

También han sido observados efectos de infecciones rickettsiales sobre la hemostasia secundaria y la fibrinólisis. Wilson (314) expone el caso de un perro con infección natural con *A. platys*, cuyo tiempo de coagulación activado no fue afectado por la infección. En infecciones con *E. canis* se han reportado resultados variables, tiempos de coagulación no alterados (137, 140, 141, 260) o, prolongación de los mismos (65).

Por otra parte, Morris *et al.* (208) observaron en ponis infectados experimentalmente con *Neorickettsia risticii*, también perteneciente a la Familia *Anaplasmataceae*, alteraciones en las concentraciones de fibrinógeno, fibronectina, Factor VIII,  $\alpha$ -2 antiplasmina, plasminógeno y productos de degradación de fibrina/fibrinógeno (PDF). Así mismo, se reportó aumento del nivel del factor von Willebrand (FvW), descenso de la relación FVIII:C/FvW:Ag, activación de la vía extrínseca de la coagulación y aumento del fibrinógeno en la FMMR y en la FMM (86).

En ciertas infecciones se activa el sistema de la coagulación, evocando un síndrome de hipercoagulabilidad, con la consiguiente formación de trombos en toda la

microcirculación, lo que resulta a su vez en consumo de factores de la coagulación y de plaquetas, conociéndose esta condición clínica como coagulación intravascular diseminada (CID). Simultáneamente y secundario a la activación de la cascada de la coagulación, se activa el sistema fibrinolítico. Casos de CID en FMMR, en FMM (86) y en ehrlichiosis granulocítica (22), así como en babesiosis (89) han sido documentados.

Con la finalidad de profundizar sobre la relación de la infección experimental con *A. platys*, de importancia en veterinaria y en salud pública, con la hemostasia, se plantea el presente trabajo, donde se pretende avanzar en el conocimiento de las posibles causas de la trombocitopenia provocada por esta rickettsia, estudiando la presencia de anticuerpos antiplaquetas, el daño endotelial (vasculitis) por medio del FvW y del tiempo de lisis de euglobulina, así como los signos clínicos. También se evaluó el aspecto funcional de las plaquetas, a través de la medición de las respuestas de agregación y secreción de ATP por las plaquetas. Por otra parte, se analizaron las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación sanguínea, así como el Factor XIII y, fue valorada la fibrinólisis mediante la determinación de los PDF y del tiempo de lisis del coágulo de euglobulina.

Para lo cual, se trazaron los siguientes objetivos:

## **Objetivo general**

Evaluar la hemostasia en perros de raza Beagle infectados experimentalmente con una cepa de *Anaplasma platys*.

## **Objetivos específicos**

1°) Evaluar algunas variables de la hematología (hemoglobina, hematocrito, CHCM, leucocitos y recuento diferencial de leucocitos) en perros de raza Beagle infectados experimentalmente con *A. platys*.

2°) Evaluar algunas variables de la hemostasia primaria (recuento de plaquetas, agregación y secreción plaquetaria y factor von Willebrand) en perros de raza Beagle infectados experimentalmente con *A. platys*.

3°) Evaluar algunas variables de la hemostasia secundaria (tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, Factor XIII y concentración de fibrinógeno) en perros de raza Beagle infectados experimentalmente con *A. platys*.

4°) Evaluar algunas variables de la fibrinólisis (productos de degradación de la fibrina y tiempo de lisis del coágulo de euglobulina) en perros de raza Beagle infectados experimentalmente con *A. platys*.

5°) Determinar la presencia de anticuerpos antiplaquetas en perros de raza Beagle infectados experimentalmente con *A. platys*.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### *Anaplasma platys*

*A. platys* es una bacteria intracelular obligatoria, Gram negativa, perteneciente al orden *Rickettsiales*, a la familia *Anaplasmataceae* y al género *Anaplasma*, que infecta a las plaquetas de caninos *in vivo* (82).

### *Morfología y diagnóstico*

La rickettsia intraplaquetaria *A. platys* puede ser observada, mediante microscopía de luz, como pequeñas inclusiones de color azul oscuro a púrpura dentro de las plaquetas. La observación debe ser realizada en extendidos de sangre periférica o en frotis de capa blanca (FCB), teñidos con colorantes tipo Romanowsky (Giemsa, Wright, Diff-Quick o Hemacolor) (13, 128).

Por microscopía electrónica de transmisión (MET), los microorganismos se observan sin dificultad dentro de una vacuola en el citoplasma de las plaquetas, formando inclusiones que contienen un número variable de organismos. En ocasiones puede llegar a encontrarse más de una vacuola en estas células (14).

Cada organismo anaplasma se encuentra rodeado de dos membranas, una interna y otra externa. Se han observado anaplasmas con dos configuraciones diferentes, una de núcleo denso y otro reticular. La conformación de núcleo denso, mas pequeña, contiene un conglomerado de hebras de cromatina relativamente denso, pudiendo estar ubicado, tanto central como excéntricamente. La configuración reticular, mas grande, contiene una matriz de hebras sueltas de cromatina, entre las cuales están esparcidos los ribosomas. Ambas configuraciones sufren fisión binaria, lo que sugiere que sea poco probable que estén asociadas a un ciclo de desarrollo (84). Los organismos individuales varían en el tamaño, entre 0,35 a 1,55  $\mu\text{m}$  de diámetro y, en la forma, encontrándose formas redondeadas, ovals o arriñonadas (84).

Por otra parte, en momentos en que la bacteriemia no está presente o está muy disminuida, el diagnóstico puede realizarse por demostración de los anticuerpos anti- *A. platys*, ya que se pueden empezar a detectar, en los perros inoculados de forma

experimental, en el día 7 postinfección (DPI) (18), entre los 13-19 DPI (96) y entre los 10 a 24 DPI (103), permaneciendo elevados hasta por 2 meses (10). La técnica para detectar estos anticuerpos es frecuentemente realizada por inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo sujeto a inexactitud por las reacciones cruzadas con los organismos de un mismo grupo genético (21, 96). Generalmente las reacciones inespecíficas a antígenos altamente conservados entre los miembros del mismo género, son observadas a muy bajos títulos (187).

Hasta ahora no ha sido demostrada la reactividad cruzada entre anticuerpos anti *E. canis* y anticuerpos anti-*A. platys* (96). Recientemente se ha clonado una proteína de membrana externa de *A. platys* (OMP p44ES), utilizando ADN aislado a partir de la sangre de cuatro perros infectados naturalmente, de Venezuela y de Taiwan-China (175). Este hallazgo va a contribuir al desarrollo de pruebas de serodiagnóstico específicas para *A. platys*, ya que las que existen hasta ahora no lo son.

Por último, la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la confirmación por el análisis de la secuencia de los productos de PCR amplificados (amplicones), se considera la prueba de diagnóstico más fiable para *A. platys* hasta la fecha (149). A pesar de la distribución mundial de *A. platys*, la información disponible sobre la diversidad genética de cepas de esta rickettsia es limitada, siendo realizados estudios en este campo en: China (54); EUA (85, 125, 201) Venezuela (125, 138, 281); Tailandia (281); Japón (209); Francia (21); Australia (198); Italia (75); Brasil (50); Chile (1); Isla de Granada (320). En Venezuela se han reportado dos cepas: *A. platys* Venezuela (281) y *A. platys* Lara (138), aisladas a partir de la sangre de perros infectados naturalmente con esta rickettsia.

La identificación bacteriana basada en el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S se facilita grandemente por la disponibilidad de sistemas comerciales. Actualmente existen distintas bases de datos, algunas públicas, cuyo acceso es libre a través de internet. Finalmente, se puede construir un árbol filogenético, que refleja, esquemáticamente, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas.

#### ***Clasificación taxonómica de A. platys***

Por análisis de las secuencias del gen ARNr 16S y el gen *groESL* depositadas antes del año 2000 en el Banco de Genes, se ha realizado una reorganización taxonómica

de los miembros del orden *Rickettsiales* (Figura 1) eliminando las tribus de la familia *Rickettsiaceae*, incorporando especies de la anteriormente denominada tribu *Ehrlichieae* a la familia *Anaplasmataceae*, dentro del orden *Rickettsiales* del *phylum* Proteobacteria (82). Los miembros del género *Anaplasma* forman un clado diferente al de los géneros *Ehrlichia*, *Wolbachia*, *Neorickettsia*, *Rickettsia* y *Orientea* en el Orden *Rickettsiales*. Cuando son alineadas las secuencias del gen ARNr 16S, todas las especies dentro de cada género comparten una similitud del 96% o más entre sus genes ARNr 16S (82, 84).

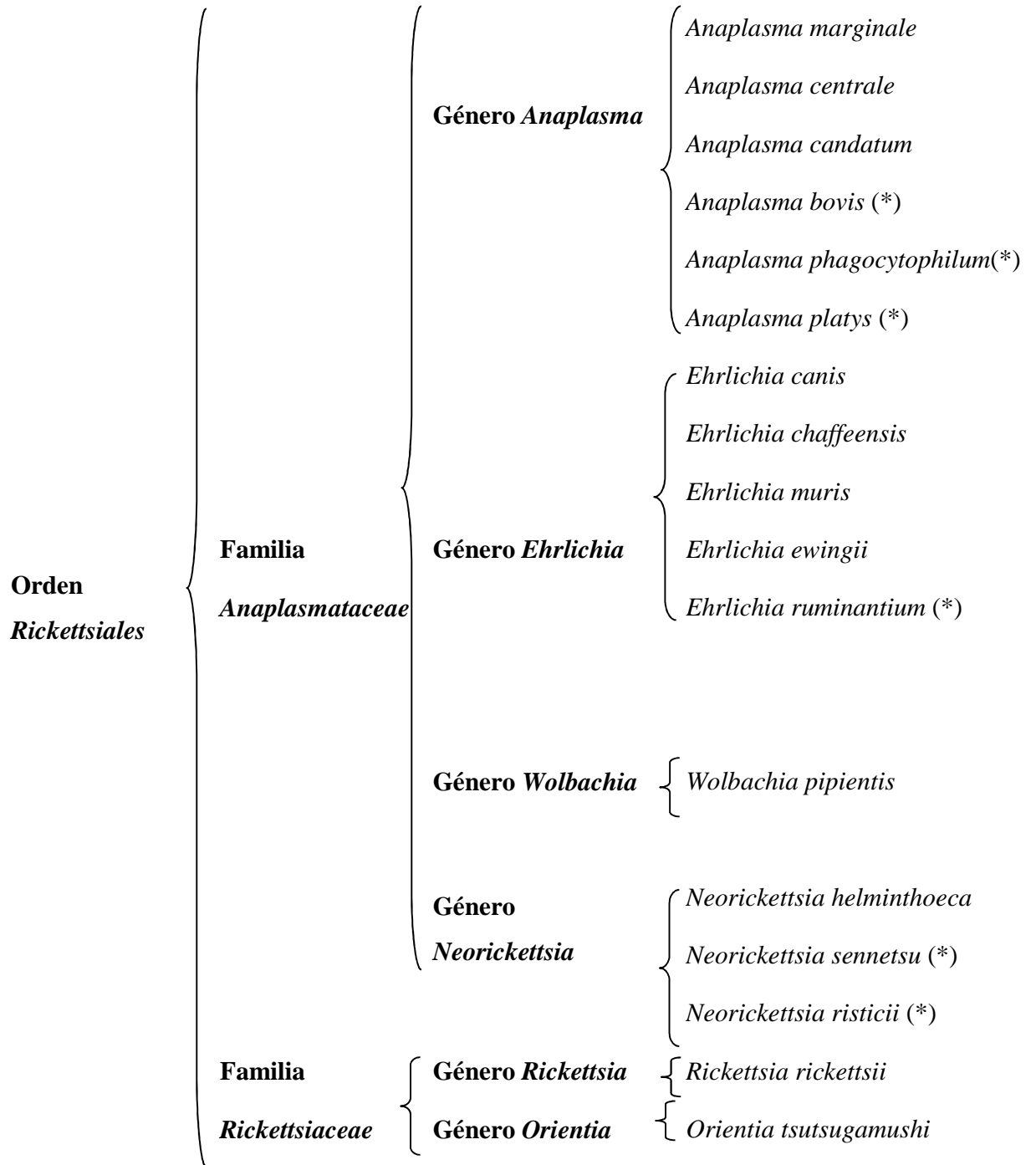
Los miembros del orden *Rickettsiales* se reorganizaron en cuatro grupos genéticos: Grupo 1: amplía el género *Anaplasma*, incluyendo en él, además de las especies hasta entonces contenidas, como son *A. marginale*, *A. centrale* y *A. candidum*; a las especies *Ehrlichia phagocytophila* (hoy llamada *Anaplasma phagocytophilum*), *Ehrlichia bovis* (actualmente *Anaplasma bovis*) y *Ehrlichia platys* (hoy *Anaplasma platys*). La especie tipo es *Anaplasma marginale*.

Grupo 2: el género *Ehrlichia* se amplía con la inclusión de *Cowdria ruminantium* (ahora *Ehrlichia ruminantium*). La especie tipo es *Ehrlichia canis*; otras especies de este género son *E. chaffensis*, *E. Ewingii* y *E. muris*. Grupo 3: el género *Neorickettsia*, cuya especie tipo es *N. helminthoeca*, quedaría ampliado al incluirse en el mismo a las especies *Ehrlichia risticii* y *Ehrlichia sennetsu* (que pasan a denominarse *N. risticii* y *N. sennetsu* respectivamente). Grupo 4: la especie *Wolbachia* será el único miembro del género *Wolbachia*.

Actualmente se le han añadido dos géneros a la familia *Anaplasmataceae*: *Aegyptianella* y *Candidatus Neoehrlichia* (187, 244). Existe una alta reacción antigénica cruzada entre las especies del mismo grupo, ya que comparten varios antígenos superficiales homólogos, en cambio, entre las especies de grupos diferentes, esta reacción antigénica cruzada es mucho menor (82, 321).

### ***Ciclo de desarrollo y transmisión***

Todos los miembros de la Familia *Anaplasmataceae* son bacterias Gram negativas intracelulares obligadas, se replican dentro de una vacuola intracitoplasmática derivada de la membrana externa de la célula eucariótica hospedadora (82). Los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Neorickettsia* se multiplican en células hematopoyéticas maduras o inmaduras, particularmente células mieloides como neutrófilos, eritrocitos y



**Figura 1. Reorganización taxonómica del orden *Rickettsiales* (Dumler et al.) (82)**

(\*) = especies incluidas en esta nueva reorganización

plaquetas, en sangre periférica o en tejidos, usualmente órganos fagocíticos mononucleares (hígado, bazo, médula ósea) de hospedadores vertebrados (82).

Estos microorganismos crecen en garrapatas vectores, no son cultivables en medio libre de células o en embriones de pollo. Algunos son cultivables en líneas celulares mielocíticas, neutrófilos, eritrocitos y en líneas celulares de garrapatas. Son agentes etiológicos de enfermedades de perros y otros cánidos, y de cabras, ovejas, llamas, entre otros. Hasta ahora no ha sido posible cultivar a *A. platys*, pero puede ser propagada por pasajes intravenosos seriados en perros susceptibles (82, 84).

Las especies *rickettsiales* incluidas en los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* son transmitidas por picadura de garrapatas (242). La garrapata vector para la transmisión de *A. platys* no ha sido bien caracterizada, sin embargo, la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) (148, 209, 255, 276), *Dermaceter auratus* (226) y *Hyaloma truncatum* (138), han sido sugeridas como posibles vectores de *A. platys*, aunque, la transmisión experimental de *A. platys* con estas garrapatas no ha sido aún demostrada (272). A pesar de que estudios experimentales hallan fallado en demostrar la competencia de *R. sanguineus* como vector de *A. platys*, esta garrapata está presente en Venezuela y podría actuar como vector en este país.

Aunque no se conoce el ligando en la célula hospedadora (plaqueta) para *A. platys*, se sabe que *A. phagocytophilum* (agente de la ehrlichiosis granulocítica humana, EGH), se adhiere a su receptor en el neutrófilo, el ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PGSL-1), una proteína de superficie que porta ácido siálico y que comparte muchas características químicas con el ligando en el eritrocito para *A. marginale*, tales como la sensibilidad a la neuraminidasa y a la quimotripsina (82, 133) .

El ciclo de vida de *A. platys* se conoce solo parcialmente, se sabe que se divide dentro de la plaqueta por división binaria (82). El género *Anaplasma*, como se describió anteriormente, incluye las siguientes especies: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum*, siendo las dos últimas especies las únicas de relevancia en medicina canina. La infección por *A. platys* es específica para las plaquetas del perro, sin embargo, en Venezuela se ha observado, en humanos, la infección directa de las plaquetas con organismos rickettsiales (11, 285, 286), lo cual incrementa la importancia del estudio de los efectos producidos por esta rickettsia.



### ***Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC)***

Es la enfermedad infecciosa producida en perros por la bacteria rickettsial *A. platys* y, recibe este nombre debido a que la bacteriemia asociada con la infección se desarrolla siguiendo un patrón cíclico, con trombocitopenia también cíclica, a intervalos de 7 a 14 días durante varios ciclos (130).

#### ***Signos clínicos***

La patogénesis de *A. platys* no es severa generalmente, pero signos clínicos como fiebre, anorexia, palidez de mucosas, hemorragias petequiales, pérdida de peso y uveítis han sido reportados (19, 36, 110, 128, 134, 168).

#### ***Hallazgos hematológicos***

La infección experimental de las plaquetas de los perros por *A. platys* produce como resultado una trombocitopenia cíclica, después de un periodo de incubación de 8 a 10 días (130). En este momento muchas plaquetas contienen inclusiones de *A. platys*, resultando en una marcada trombocitopenia (9, 10, 18, 19). El número de plaquetas retorna a la normalidad entre 3 a 4 días después de la desaparición del organismo infeccioso. Posteriormente, entre 1 a 2 semanas, los organismos reaparecen en las plaquetas y el recuento plaquetario nuevamente comienza a declinar, produciéndose trombocitopenia (130).

En líneas generales se puede decir que la trombocitopenia se sucede en episodios de 3 a 4 días de duración y se repite a intervalos de 7 a 15 días, de ahí que a la enfermedad se la haya denominado “trombocitopenia cíclica infecciosa canina”. Los valores mínimos de plaquetas se observan en el primer episodio de bacteriemia, siendo posible visualizar un gran número de plaquetas infectadas en los frotis sanguíneos. Con cada ciclo sucesivo, el porcentaje de plaquetas infectadas disminuye, hasta que solamente unas pocas plaquetas son infectadas, la trombocitopenia llega a ser menos pronunciada y eventualmente los cambios hematológicos cesan (36, 130). La duración de la rickettsemia en perros no tratados no está claramente establecida.

Otras alteraciones hematológicas observadas en la infección experimental de *A. platys* son, anemia normocítica normocrómica no regenerativa asociada con anemia por inflamación y, leucopenia. También han sido reportadas hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (19).

### ***Hallazgos histopatológicos***

Baker *et al.* (18) inocularon a perros PRP infectado con *A. platys*, no observando petequias o equimosis en las superficies mucosas. El estudio histopatológico evidenció aumento del tamaño de los ganglios linfáticos, plasmocitosis en sinusoides esplénicos, eritrofagocitosis por macrófagos en los ganglios linfáticos y en el bazo e hiperplasia folicular del bazo en el día 14 postinfección.

También se evidenciaron hemorragias y coágulos conteniendo fibrina, eritrocitos y células mononucleares, en la periferia de las cubiertas periarteriolas del bazo, hematopoyesis extramedular (bazo) e hiperplasia en la médula ósea. No fueron observadas ni vasculitis, ni daño endotelial en ninguno de los tejidos examinados.

### ***Mecanismo fisiológico de la hemostasia***

La hemostasia es el conjunto de mecanismos físicos y químicos, donde ocurre una interacción balanceada de células sanguíneas, vasculatura, proteínas plasmáticas y, sustancias de bajo peso molecular, que mantienen la fluidez de la sangre y la integridad del sistema vascular. La trombosis puede presentarse si el estímulo hemostático no es regulado, o porque la capacidad de las rutas inhibitorias estén alteradas o, más comúnmente, porque la capacidad de los mecanismos anticoagulantes están saturados por la intensidad del estímulo (61).

Existen dos sistemas que mantienen el equilibrio hemostático: 1. La coagulación, que evita una hemorragia excesiva ante una lesión. 2. El sistema fibrinolítico, que limita la magnitud del coágulo. Estos mecanismos son estructuralmente muy similares, ya que pueden ser activados por mecanismos intrínsecos y/o extrínsecos para producir una enzima activa. Por otra parte, en ambos sistemas un conjunto de inhibidores condicionan el equilibrio y limitan el proceso. El mecanismo fisiológico de la hemostasia puede dividirse (artificialmente) en tres eventos: hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis (220).

### ***Hemostasia Primaria***

La hemostasia primaria constituye la primera etapa de los mecanismos de la hemostasia y comprende una serie de eventos, los cuales incluyen vasoconstricción y formación del tapón plaquetario (adhesión plaquetaria, cambio de forma, agregación y secreción de las plaquetas).

### ***Vasoconstricción***

Los vasos sanguíneos tienen un papel crítico en el control de la hemostasia, en la trombosis y en la inflamación. Las células endoteliales, que forman el revestimiento de todos los vasos sanguíneos, son particularmente importantes en este proceso, debido a su estrecha relación con la sangre circulante. Las células endoteliales tienen la capacidad excepcional de expresar y elaborar moléculas tromborreguladoras, que pueden clasificarse como iniciales o tardías, según el estímulo de la célula endotelial (124).

El endotelio actúa como un lugar de contacto dinámico entre la sangre circulante y la pared del vaso. La pared vascular normal está compuesta de tres capas: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia. La túnica íntima está compuesta de una capa no trombogénica de células endoteliales, una membrana basal de colágeno y una membrana elástica interna (124).

Los vasos sanguíneos normales tienen tres funciones vitales en la hemostasia: 1. proveen una superficie resistente a la formación de trombos, 2. cuando se daña el endotelio, proveen el estímulo inicial para la formación del trombo, como el factor activador de plaquetas (FAP), el factor tisular (FT) y el colágeno y 3. suministran inhibidores de la activación plaquetaria (prostaciclina) y activadores como el activador del plasminógeno tisular (AP-t) para la eliminación de los trombos a través de la lisis de la fibrina (124).

En la lesión endotelial se produce una vasoconstricción refleja, que tiene como finalidad evitar la pérdida de sangre, principalmente en la microvasculatura y, provocar variaciones en la velocidad y tipo de flujo sanguíneo, para permitir la activación de las plaquetas. Este proceso es mediado por la interacción del sistema nervioso autónomo, células musculares y varios mediadores, tales como serotonina, adrenalina, noradrenalina y otros (200).

La vasoconstricción es un proceso extremadamente rápido, el cual, de forma efectiva, detiene el sangramiento de los vasos sanguíneos pequeños, pero no puede prevenir el sangramiento en los vasos sanguíneos más grandes, por tanto, otros mecanismos también relativamente rápidos son necesarios, especialmente las reacciones de adhesión y agregación plaquetaria (167). Inmediatamente a la vasoconstricción se desarrollan los procesos de adhesión plaquetaria, cambio de forma, agregación y

secreción de las plaquetas. A continuación se describirán primero los aspectos morfológicos de las plaquetas, antes de explicar sus funciones.

### ***Las plaquetas***

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados y son las partículas celulares más pequeñas que normalmente circulan en la sangre de mamíferos. Cuando están en reposo (inactivas) presentan forma de disco con superficies lisas. Cuando se activan cambian a la forma esférica, pudiendo emitir largas prolongaciones en varias direcciones. Pueden variar en el tamaño (1-5 $\mu$ m en el perro) (312), siendo aproximadamente de la mitad a un tercio del tamaño de los eritrocitos.

En las trombocitopenias en remisión pueden aparecer en la sangre periférica formas gigantes llamadas macroplaquetas, que llegan a alcanzar el tamaño del eritrocito (90). Son sintetizadas en la médula ósea y liberadas a la circulación por la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos. Cada megacariocito libera varios miles de plaquetas dentro de la circulación. Su síntesis es estimulada por la hormona trombopoyetina, la cual se consigue en bajas concentraciones en el plasma (173).

El recuento de plaquetas en la sangre de los perros es aproximadamente 200.000-500.000/ $\mu$ L, dos terceras partes se encuentran en la sangre y una tercera parte se localiza en el bazo. Se considera estado de trombocitopenia en el perro cuando existen menos de 200.000/ $\mu$ L y trombocitosis cuando supera los 500.000/ $\mu$ L (90).

Las plaquetas viejas son removidas de la circulación por macrófagos tisulares, principalmente del bazo, hígado y médula ósea (16). El bazo es un factor significativo en la determinación de la sobrevivencia de las plaquetas del perro, pudiéndose obtener un alargamiento significativo de ésta después de la esplenotomía (70).

El mecanismo por el cual la esplenectomía permite que las plaquetas caninas sobrevivan más tiempo no está claro, una explicación es que los macrófagos esplénicos son más capaces de monitorear cambios dependientes de la edad en las plaquetas circulantes, que los macrófagos del hígado y de la médula ósea, los sitios secundarios para remoción plaquetaria. En ausencia del bazo, estos otros macrófagos con estándares menos exigentes serían ahora los responsables de la remoción de las plaquetas seniles (70). La vida media de las plaquetas normales de los perros es de 9 días según Smith *et al.* (273), mientras otros estudios reportan una vida media de 6 días (70, 132).

### ***Estructura de la plaqueta***

El proceso de activación de la plaqueta, estimulado por diferentes agonistas solubles, tales como trombina y adenosin difosfato (ADP), o proteínas insolubles de la matriz de la pared del vaso sanguíneo, tales como colágeno o factor von Willebrand (FvW), resulta en una dramática reorganización de la membrana plaquetaria, citoesqueleto y organelos citoplasmáticos (61). La ultraestructura de las plaquetas activadas y no activadas se muestra en la Figura 2.

### ***Membrana plaquetaria***

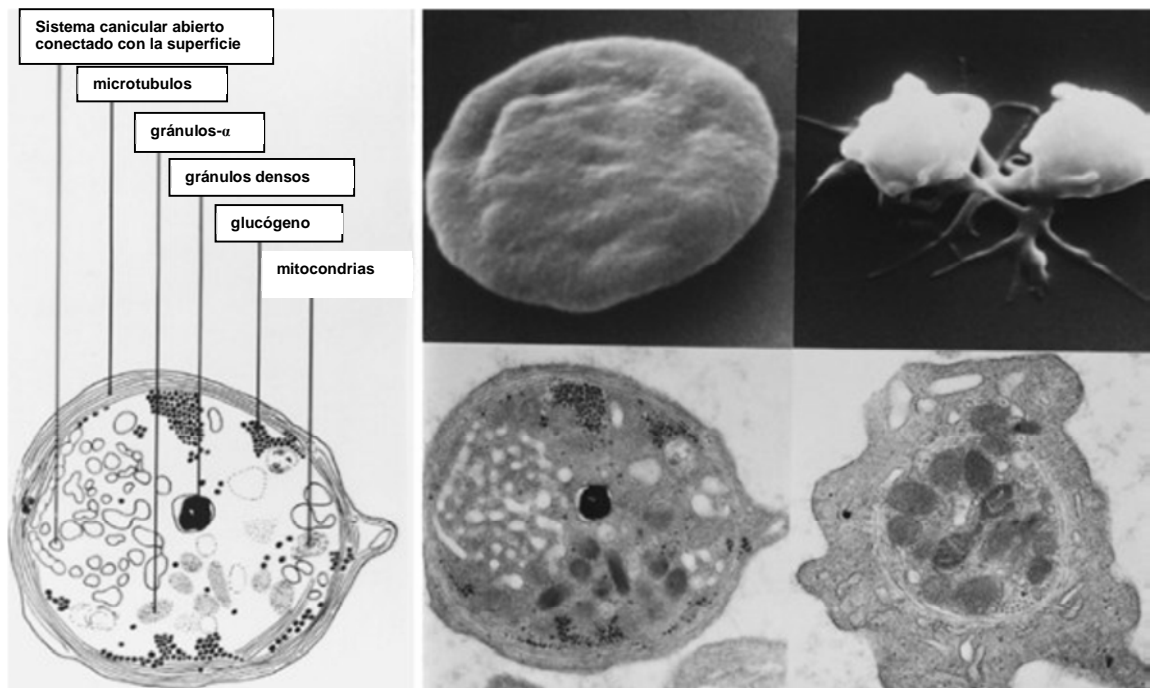
La membrana plaquetaria tiene la estructura trilaminar clásica, con una doble capa de fosfolípidos (FL) y proteínas integrales embebidas, se invagina para dar lugar a un sistema de canales y canalículos que forman una red dentro del citoplasma, llamada sistema canicular abierto conectado con la superficie (SCCS).

Un sistema de membrana interna diferente es el sistema tubular denso (STD), derivado del retículo endoplásmico del megacariocito. Este sistema concentra un depósito de calcio almacenado, análogo al retículo sarcoplásmico del músculo, y es el sitio de síntesis de prostaglandinas (108).

Existen alrededor de 30 proteínas integrales en la plaqueta, que incluyen antígenos, receptores de glicoproteínas (GP) y varias enzimas embebidas en la membrana (69). Las GP receptoras están ancladas en la membrana plasmática, sobre la superficie plaquetaria o dentro en el SCCS, así como en la membrana de los gránulos densos.

Las GP más importantes de la membrana de las plaquetas son la GP IIb-IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) y la GPIb-IX-V. La GPIIb-IIIa es un miembro de la familia de las integrinas de receptores de membrana, llamadas así porque integran los ligandos extracelulares con el citoesqueleto intracelular (108). La GPIIb-IIIa es la GP más abundante sobre la superficie de la membrana celular y es también abundante sobre la membrana de los gránulos densos. Después de la activación plaquetaria, la densidad de receptores GPIIb-IIIa funcionales aumenta hasta el doble (142). El principal ligando para GPIIb-IIIa es el fibrinógeno, uno de los mediadores principales de la agregación, aunque también puede unir FvW, fibronectina, y otras proteínas adhesivas (251).

La GP IIb-IIIa en las plaquetas en reposo tiene baja afinidad por el fibrinógeno y



**Figura 2. Micrografía electrónica de plaquetas en reposo y activadas. Las fotografías superiores son micrografías electrónicas escaneadas, a la izquierda, mostrando la forma de disco de una plaqueta normal circulante (x 20.000) y a la derecha la forma esférica de una plaqueta activada con muchos pseudópodos (x 10.000). Las fotografías inferiores son micrografías electrónicas de transmisión de una sección transversal de las plaquetas. A la izquierda, en reposo (aumento x 21.000), con un dibujo complementario (más a la izquierda), mostrando las estructuras subcelulares. A la derecha, activada (x 30.000). La constricción de un anillo microtubular rodea los gránulos centralizados, pudiendo ser vista la formación de pseudópodos. Tomada de Colman *et al.* (60)**

otros ligandos solubles. Cuando las plaquetas son activadas por sustancias estimuladoras, resulta en un cambio conformacional de GPIIb-IIIa, que aumenta la afinidad para unir a su ligando (266, 267).

La GPIb-IX-V es un complejo heterodímero, que existe principalmente sobre la superficie plaquetaria y su concentración disminuye durante la activación plaquetaria, con translocación desde la superficie al interior de la plaqueta (dentro del SCCS). Es el principal receptor para el FvW, por tanto es el principal responsable de la adhesión plaquetaria al subendotelio (224).

### ***Citoesqueleto plaquetario***

La forma discoide de la plaqueta es mantenida por un citoesqueleto membranoso compuesto de actina, espectrina, proteínas asociadas y una banda circunferencial de microtúbulos (filamentos de tubulina), localizada inmediatamente debajo de la membrana. Durante la activación de la plaqueta los microtúbulos se contraen, permitiendo que la plaqueta se vuelva esférica y dirigen el movimiento de los gránulos secretorios hacia el centro de la célula (311).

Por otro lado, la actina y la miosina son rápidamente ensambladas en microfilamentos una vez que la plaqueta se activa, suministrando una fuerza contráctil para el cambio de forma y la formación de pseudópodos. Otra función del citoesqueleto es servir de sitio de anclaje a la porción citoplasmática de los receptores transmembrana y para transmitir señales desde el interior hacia la superficie plaquetaria, desde el sitio del receptor del ligando (señalización dentro-fuera) (61).

### ***Gránulos plaquetarios***

La plaqueta no tiene núcleo, ni tampoco organelos sintetizadores de proteínas, tales como retículo endoplásmico rugoso o aparato de Golgi. Contiene mitocondrias, gránulos de glucógeno, tres tipos de gránulos dispersos dentro del citoplasma: gránulos alfa, gránulos densos (gránulos delta), y gránulos lisosómicos. Los gránulos alfa son los principales gránulos secretorios plaquetarios y son también los más numerosos y prominentes organelos plaquetarios. La ultraestructura de los gránulos (Figura 2) está caracterizada por una región nucleoide densa que contiene proteoglicanos y proteínas básicas específicas de plaquetas, factor plaquetario 4 y  $\beta$ -tromboglobulina, una zona mas clara contiene FvW. Las proteínas que contienen estos gránulos alfa son adquiridas

por varios mecanismos: a) síntesis endógena, b) endocitosis mediada por receptor y c) pinocitosis de fase fluida (97). La membrana de los gránulos alfa contiene un número de moléculas receptoras, algunas como la P-selectina, osteonectina, y GP IIb-IIIa son específicas de estos gránulos, están ausentes de la membrana plasmática de las plaquetas en reposo, la P-selectina en particular llega a ser un marcador de activación cuando es expresada sobre la superficie celular. Igual razonamiento se aplica para las proteínas solubles  $\beta$ -tromboglobulina y FP4, las cuales cuando son detectadas en plasma, son marcadores agudos de la secreción plaquetaria y por tanto de activación (69).

Los gránulos densos son menores en número en comparación con los gránulos alfa, y son fácilmente reconocidos por su núcleo denso rodeado por un halo claro (Figura 2), siendo los organelos de almacenaje de moléculas pequeñas: pool no metabólico de ATP, ADP, serotonina, calcio, magnesio, etc., mas que de proteínas. El contenido de estos gránulos es secretado por las plaquetas humanas durante la reacción de liberación. La proporción relativa de estos constituyentes varía entre las especies (69, 97).

Los lisosomas son pocos, contienen varias enzimas hidrolíticas y su función aún no está clara, se asume que tienen un papel de digestión del coágulo y de los componentes de la matriz vascular, como parte de la curación de la herida (224).

### ***Función plaquetaria***

Las plaquetas son un componente esencial en la hemostasia, deteniendo en un inicio el sangramiento. Las reacciones involucradas incluyen la adhesión al sitio de corte del vaso sanguíneo (sitio de daño endotelial), extensión de las plaquetas adheridas sobre la superficie subendotelial expuesta, secreción de los constituyentes de los gránulos, y formación de agregados plaquetarios grandes (tapón plaquetario) (256).

Además de estas reacciones, la membrana plaquetaria llega a exponer sitios de adsorción de factores de coagulación, acelerando la coagulación sanguínea, lo que resulta en la formación de una red de fibrina que va a reforzar el tapón plaquetario. Este coágulo de plaqueta-fibrina posteriormente se retrae a un volumen mas pequeño, proceso también dependiente de la plaqueta.

### ***Formación del tapón plaquetario***

El tapón hemostático primario resulta de la transformación de las plaquetas de inactivas en activas y se forma en una secuencia específica de cuatro procesos diferentes



llamados adhesión, activación, agregación y secreción (61).

### ***Adhesión de las plaquetas al subendotelio***

Es el primer paso en la formación del tapón hemostático. Cuando se lesiona el endotelio se produce hemorragia y las plaquetas se escapan de los vasos sanguíneos, fluyendo al interior de los tejidos endoteliales. Inmediatamente, las plaquetas (inactivas) se adhieren, a través de sus receptores: la integrina  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa-IIa) y la GPVI, a las fibrillas de colágeno del subendotelio expuesto y al FvW (167).

El FvW se enlaza, tanto a las fibras de colágeno del subendotelio, como al complejo GPIb-IX-V (receptor constitutivamente activo) en la superficie de la plaqueta, convirtiéndose en un puente que conecta la plaqueta a la fibra de colágeno (219). Esta interacción FvW- GPIb-IX-V es esencial para la captura inicial de la plaqueta en el área de la lesión, ya que minimiza fuertemente la movilidad de la plaqueta. Por tanto el FvW actúa como una clase de pegamento molecular (167, 215).

La adhesión plaquetaria inicia una cascada de señalización intracelular, que desencadena el cambio de forma de la plaqueta y secreción y activación de GPIIb-IIIa. Estas reacciones finalmente resultan en la formación de interacciones plaqueta-plaqueta, que conducen a la formación del tapón o agregado plaquetario. Por tanto, se requiere la interacción sinérgica de los receptores GPIIb-IIIa y GPIb-IX-V, así como de sus ligandos principales, fibrinógeno y FvW, para que se pueda formar el tapón plaquetario (251).

### ***Activación de las plaquetas***

Comprende un conjunto de cambios bioquímicos, desencadenados por la adhesión de las plaquetas al colágeno a través del FvW. A los agentes que inducen la activación de las plaquetas se les llama agonistas, éstos poseen un receptor en la superficie de la plaqueta, al que se unen, formando un complejo agonista-receptor (3, 224). Uno de estos agonistas es el colágeno que, como se mencionó anteriormente, se une a la plaqueta a través de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa-IIa) y de la GPVI (Abrams y Brass, 2006) (3).

Las plaquetas se unen de dos formas diferentes a este agonista. Pueden unirse a) directamente al colágeno a través de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  y la GPVI, que trabaja en conjunto con la cadena  $\gamma$  del receptor Fc (GPVI-FcR $\gamma$ ) (requiriéndose la interacción del colágeno con estos dos receptores para una respuesta completa de la plaqueta, o b)

también pueden unirse indirectamente al colágeno por medio del FvW y el complejo GPIIb-IX-V en la plaqueta, formándose un puente entre el FvW anclado al colágeno del subendotelio y la plaqueta circulante, como se explicó anteriormente (155). Una vez unido el colágeno a sus receptores en la plaqueta, se inducen cascadas de señalización intracelular que promueven la secreción de ADP y la producción y liberación de TXA<sub>2</sub>. El ADP y el TXA<sub>2</sub> se unen a sus propios receptores sobre las plaquetas, generando señales que apoyan los efectos más directos del colágeno (155).

La vía de señalización del colágeno, inmunoglobulinas y FvW depende de tirosinas quinasas no receptoras. Una vez que se une el colágeno a la GPVI-FcR $\gamma$ , se promueve la fosforilación de la tirosina del fragmento de activación basado en tirosina del receptor inmune (ITAM) de la cadena  $\gamma$ , mediante las tirosinas quinasas Lyn y Fyn, con la siguiente unión y activación de la tirosina quinasa Syk. Esta proteína Syk parece tener un papel crítico en la activación plaquetaria por el colágeno, ya que las plaquetas de ratones sin Syk no se agregan en respuesta al colágeno (155). La estimulación plaquetaria del colágeno también produce la activación de la fosfolipasa C $\gamma_2$  (PLC $\gamma_2$ ), lo que provoca la hidrólisis de fosfoinosítoles induciendo la activación de GPIIb-IIIa. Esta activación provoca la capacidad de unión de ligandos solubles, los cuales, a su vez, conducen a la activación de Syk, contribuyendo a la polimerización de actina, cambio de forma, expansión y contracción plaquetaria (155).

Existen agonistas que provienen de la misma plaqueta, como el ADP liberado por los gránulos densos de las plaquetas, que se une principalmente a dos receptores sobre la membrana plaquetaria, receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> e inicia la agregación plaquetaria (152). La serotonina interactúa con el receptor 5-HT-2 y el tromboxano A<sub>2</sub> (producto de la síntesis de la ciclooxigenasa) se une a un receptor específico de tromboxano (TP $\alpha$  y TP $\beta$ ). Todos estos agonistas se unen a receptores transmembrana acoplados a proteína G, una vez unidos inducen un proceso de señalización que conduce a la activación de la GPIIb-IIIa (136).

Otros agonistas son la epinefrina (también llamada adrenalina) que se une al receptor  $\alpha$ -adrenérgico y la trombina que se une a los receptores: receptor activado por proteasas 1 (RAP-1) y RAP-4 (62). La mayoría de estos agonistas causan la activación de la glicoproteína GPIIb-IIIa, pero en cambio la trombina causa directamente la

secreción plaquetaria, es decir activa a la plaqueta por un mecanismo que no requiere de agregación, y es independiente de la actividad de la ciclooxigenasa (302).

### ***Señalización intracelular plaquetaria, aspectos bioquímicos de la activación plaquetaria***

La interacción de un agonista con su receptor en la superficie plaquetaria causa la activación de dos rutas de activación principales, la ruta de la hidrólisis de los fosfatidilinosítidos y la ruta de los eicosanoides. El resultado del enlace por todos los agonistas es similar (15).

#### ***Ruta de la hidrólisis de los fosfatidilinosítidos***

Comienza con la activación de la fosfolipasa C (PLC) (Figura 3), una enzima de membrana que en la plaqueta presenta dos isoformas  $\beta$  y  $\gamma$ . La forma  $\beta$  es activada por una proteína G, escindiendo al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub> o PI4,5-P<sub>2</sub>) de membrana, rindiendo dos compuestos: el diacilglicerol (DAG), que se queda unido a la membrana, y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub> o I1,4,5-P<sub>3</sub>), que se traslada al citosol; ambos actúan como segundos mensajeros (25, 58).

El DAG activa a la proteína quinasa C (PKC), una vez activada, esta enzima conduce a la fosforilación de la proteína intracelular P47 hasta P47-PO<sub>4</sub>. La P47-PO<sub>4</sub> en conjunto con tromboxano y CLM-PO<sub>4</sub> (cadena liviana de miosina fosforilada) estimulan la secreción de los gránulos densos y lisosomales. El segundo producto de la hidrólisis de la PLC, el IP<sub>3</sub>, se une a receptores sobre la membrana de los túbulos densos y provoca la liberación de calcio de esta estructura membranosa, aumentando, así, el calcio citosólico plaquetario (39).

#### ***Ruta eicosanoide o del Acido Araquidónico (AA)***

Los eicosanoides se forman desde el AA (Figura 3), que es liberado de los fosfolípidos de la membrana por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) durante la activación plaquetaria. Una vez liberado, el AA puede ser metabolizado a prostanoides y leucotrienos. Los prostanoides son formados por la enzima ciclooxigenasa en las plaquetas e incluye a endoperóxidos y tromboxanos.

En la plaqueta, la ruta predominante para el metabolismo del AA conduce a la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), el cual es un poderoso activador de plaquetas (98). Un incremento del calcio intracelular es una constante que acompaña a la activación de

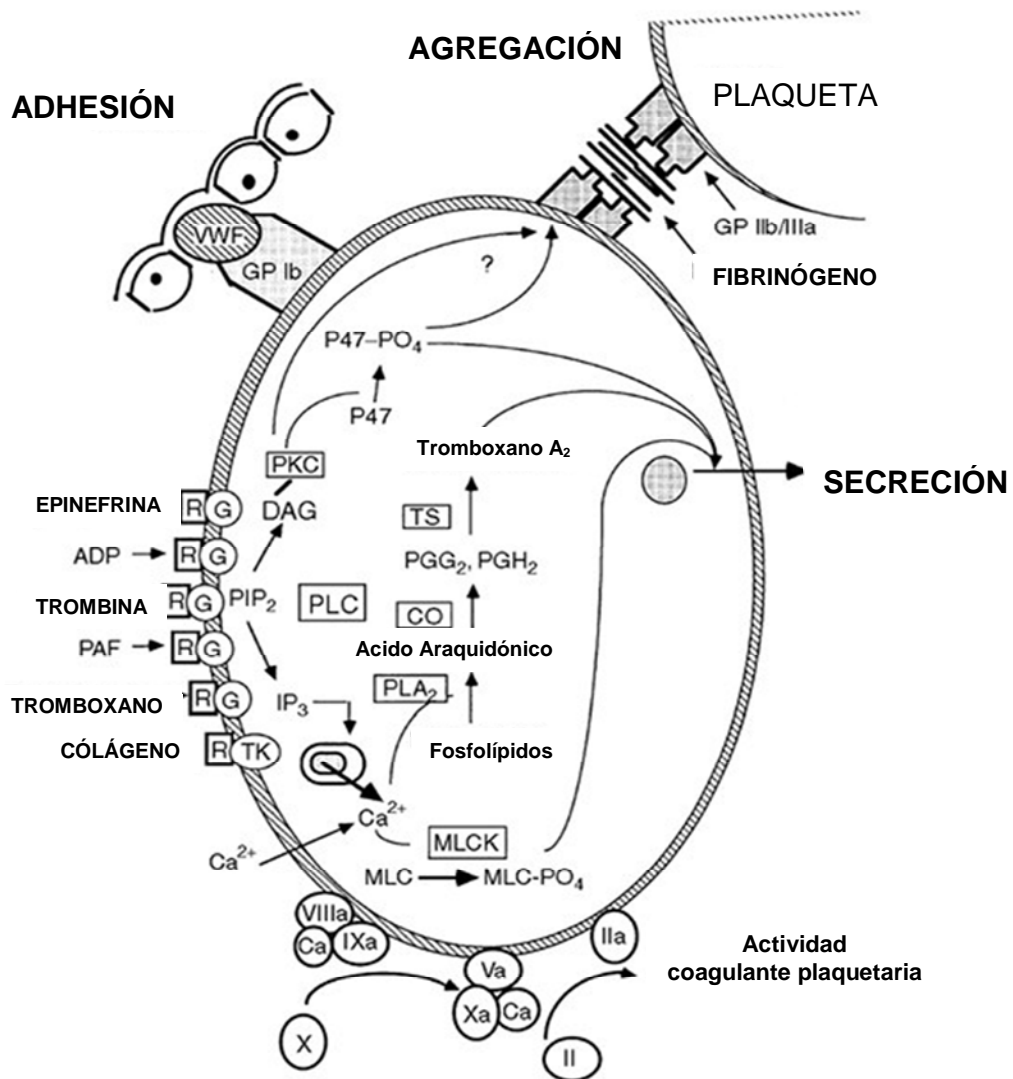


Figura 3. Visión general de la hemostasia. ADP (adenosín difosfato), TxA<sub>2</sub> (tromboxano A<sub>2</sub>), CO (ciclooxigenasa), TS (tromboxano sintetasa), MLCK (quinasa de la cadena liviana de miosina), FvW (Factor von Willebrand), G (proteína G), TK(tirosina quinasa), PLA, PLC(fosfolipasas A y C), PIP<sub>2</sub> (Fosfoinositol bifosfato), IP<sub>3</sub> (Inositol trifosfato), DAG (Diacilglicerol) (Tomado de Colman *et al.*) (60)

las plaquetas y es mediada por el  $IP_3$ . Una variedad de enzimas implicadas en la señalización requieren de calcio, incluyendo  $PLA_2$ , PLC, y la quinasa de la cadena liviana de la miosina. El aumento de calcio intracitoplasmático causa diferentes respuestas plaquetarias, dependiendo del agonista que esté actuando (61).

Estas respuestas incluyen cambio de forma, exposición del receptor de fibrinógeno, secreción de gránulos densos, secreción de gránulos alfa, liberación de AA y liberación de hidrolasas ácidas. La interacción agonista-receptor también puede causar la entrada de calcio, desde el medio extracelular al citoplasma, a través de receptores que operan canales de calcio (224).

#### ***Efectos de la activación plaquetaria: Cambio de forma, agregación y secreción***

El cambio de forma de la plaqueta es considerado el índice más sensible de activación plaquetaria. Se refiere a la transformación de las plaquetas desde la forma de disco a la esférica, con proyecciones espinosas llamadas pseudópodos. Esta transformación está asociada con la activación del aparato contráctil del citoesqueleto (fosforilación de la miosina, polimerización de los filamentos de actina) (129).

#### ***Agregación plaquetaria***

La agregación plaquetaria puede ser definida como el proceso por medio del cual las plaquetas se unen unas a otras (cohesión) y toma lugar después de que las plaquetas han sido activadas por agonistas. Cuando la plaqueta es activada por un agonista, se forman puentes entre plaquetas adyacentes (plaqueta-fibrinógeno-plaqueta), que conducen a la formación de un agregado de plaquetas. Estos puentes se pueden formar porque el fibrinógeno posee dos sitios de unión a la plaqueta.

Si llegase a faltar alguno de estos tres componentes: calcio, GPIIb-IIIa o fibrinógeno, las plaquetas no agregarían en respuesta a los agonistas (61). Dependiendo del tipo de agonista o de la concentración del agonista usado, la agregación puede proceder en dos ondas o fases, generalmente llamadas agregación primaria y secundaria. La primera es reversible y la segunda irreversible (64).

La agregación primaria (1ª fase) se refiere a la agregación directa de las plaquetas por agonistas exógenos tales como ADP, adrenalina, trombina y ristocetina. La segunda fase de agregación es mediada a través de la liberación de ADP endógeno (309).

Agregación inducida por ADP: al exponer las plaquetas al ADP, éste se unirá a los receptores específicos presentes en la membrana plaquetaria, causando la activación de la plaqueta, lo que desembocará en la liberación de Acido Araquidónico (AA) desde los fosfolípidos de la membrana, por la activación de las fosfolipasas, metabolizándolo a TXA<sub>2</sub>, con la consecuente contracción y liberación del contenido plaquetario al medio (224).

Al estimular las plaquetas con ADP, lo primero que se observa en el registro de agregación es un desplazamiento hacia el margen de menor transmitancia ( $\uparrow$ DO), ésto se explica por el cambio de forma de la plaqueta, desde la discoidal hasta la esferoidal con seudópodos, lo que origina una mayor DO en la muestra; este proceso dura aproximadamente 16 segundos (s) y luego el trazo se dirige hacia el margen de máxima transmitancia (224).

La curva de agregación inducida con ADP es bifásica, la primera ola se considera como el proceso que involucra la formación de puentes de fibrinógeno. La segunda ola o fase de la agregación corresponde a la fase de liberación (secreción) del contenido de los gránulos plaquetarios. Al liberarse al medio las sustancias proagregantes como ADP, serotonina y Ca<sup>2+</sup> se amplifica el estímulo original. A concentraciones de ADP >2,5 $\mu$ M no puede distinguirse la primera de la segunda ola (224).

Agregación con Colágeno: el colágeno es una proteína insoluble, componente del subendotelio, al cual las plaquetas se adhieren, en una interacción que requiere FvW. Esta interacción entre las plaquetas, FvW y colágeno es también capaz de causar liberación del contenido de los gránulos densos y agregación de las plaquetas (64).

Por otra parte, como se mencionó antes, el colágeno también puede unirse directamente a la plaqueta, a través de los receptores de colágeno ubicados en su membrana (GPVI-FcR $\gamma$ ) (155). La agregación plaquetaria inducida con colágeno es dependiente de una ruta de tromboxano intacta; la inhibición de esta ruta por sustancias como indometacina resulta en agregación inducida con colágeno alterada (64).

Al agregar colágeno al PRP se produce inicialmente un periodo de latencia de aproximadamente 1 minuto, de longitud variable, dependiente de la concentración de colágeno añadido y de la reactividad plaquetaria, hasta que comienza una curva de

agregación monofásica, dependiente de la formación de tromboxano y secreción subsiguiente. Se considera que esta latencia es el tiempo necesario para que las plaquetas se adhieran a las fibrillas de colágeno y sufran un cambio de forma y liberación (61).

La interacción del colágeno con las plaquetas libera calcio lentamente desde un depósito intracelular, resultando en un cambio de forma de estas células. La agregación y secreción se inician cuando la concentración intracelular de calcio llega a ser adecuada para activar a las fosfolipasas, resultando en liberación de ácido araquidónico desde los fosfolípidos de la membrana y formación de tromboxano (64).

La capacidad para unir FvW y activar plaquetas depende más de la estructura del colágeno que del tipo de colágeno. En este sentido, el colágeno fibrilar es mejor agente activante plaquetario que los monómeros de colágeno (64). Una eventual disminución o bloqueo de la agregación plaquetaria con colágeno podría ser ocasionada por bloqueo de la vía de la ciclooxigenasa con disminución de síntesis y de liberación de tromboxano, debido a que el tromboxano se requiere como mediador en la activación plaquetaria y, para la secreción de cantidades adecuadas de las sustancias contenidas en los gránulos plaquetarios. Se ha demostrado esta dependencia del TXA<sub>2</sub> para la activación plaquetaria por colágeno a concentraciones de 0,3 , 1 y 3 µg/mL, en plaquetas sanas tratadas con indometacina (72).

A una alta concentración de colágeno, alteraciones de la agregación podrían atribuirse a interferencia en la unión del colágeno a sus receptores sobre la membrana plaquetaria, a alteración de la liberación de calcio desde sus vesículas, a defectos en la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios inducida por el calcio, y/o a reducida respuesta plaquetaria a los agonistas de agregación secundaria como el ADP (159).

Agregación con Trombina: la trombina es el más potente de todos los agonistas plaquetarios y no depende de la ruta del tromboxano para su actividad. La trombina es capaz de causar secreción directamente (es un secretagogo directo). Este agonista es también extremadamente potente en elevar la concentración de calcio citosólico plaquetario, una propiedad probablemente responsable de la capacidad de la trombina para causar agregación y secreción (64). La trombina se usa en concentraciones cercanas a 0,024 U/mL en PRP (224).

Por varias razones la trombina no se utiliza frecuentemente en el laboratorio clínico para ensayos de reactividad plaquetaria. Primero, la trombina es algo difícil de usar, porque la concentración a la cual causa agregación plaquetaria es cercana a aquellas que causan coagulación del plasma. Además, debido a que la trombina es un secretagogo directo, casi siempre causa agregación plaquetaria, por lo tanto, no se gana mucha información utilizando trombina para ensayos de función plaquetaria (64). Sin embargo, un uso potencial de la trombina depende de su capacidad secretoria directa, la trombina puede ser añadida a la plaqueta que se sospeche de deficiencia del depósito de almacenamiento, y la cantidad de ATP liberado puede ser cuantificado con el lumiagregómetro.

De esta manera se pueden distinguir defectos del depósito de almacenamiento de los defectos de la ruta del tromboxano en las plaquetas, semejante al obtenido por el uso de la aspirina (64).

La enzima trombina se une a sus receptores RAP-1 y RAP-4 en la membrana plaquetaria, los cuales también son sus sustratos, rompiéndolos y activándolos e iniciando así, la activación plaquetaria. La activación de RAP-1 a bajas concentraciones de trombina estimula un rápido y transitorio aumento del calcio intracelular. La activación de RAP-4 a altas concentraciones de trombina estimula un rápido pero más sostenido aumento del calcio intracelular que aquel iniciado por RAP-1 (151). Estos dos receptores se activan uniéndose a la proteína G en las plaquetas y en otras células, después de que se le ha eliminado un péptido de 41 aminoácidos del extremo N-terminal extracelular. La retirada de este péptido por la trombina da lugar a un nuevo extremo amino terminal, que actúa como un ligando de anclaje al unirse a otra región del RAP-1, para activar al receptor e iniciar la señal de transducción.

Cuando las plaquetas se exponen a concentraciones hipoagregantes de trombina, se hacen relativamente insensibles a la adición de una concentración agregante de trombina, un proceso denominado desensibilización homóloga. Una parte de este mecanismo implica la internalización rápida del RAP-1, pero probablemente también estén implicados otros cambios bioquímicos (224). La trombina puede unirse a la GPIIb $\alpha$ , y las plaquetas de los pacientes que carecen del complejo GPIIb-IX (síndrome de Bernard Soulier) tienen una agregación plaquetaria inducida por trombina disminuída. A



pesar de estos datos, no está claro que la unión de la trombina a la GPIIb $\alpha$  inicie una señal o tenga un significado fisiológico (224).

### ***Secreción plaquetaria***

También llamada reacción de liberación, es el proceso mediante el cual las plaquetas liberan el contenido de sus tres tipos de gránulos internos. La secreción marca la fase final de la activación plaquetaria, y es la causa de la agregación secundaria. La reorganización que sufre el citoesqueleto en la plaqueta activada produce la centralización de los gránulos, que en presencia de altas concentraciones de calcio citoplasmático, conduce a la fusión de la membrana de éstos con la membrana de los canalículos intracelulares y a la secreción de su contenido (secreción plaquetaria) (97).

Las plaquetas tienen una maquinaria que produce y utiliza ATP. Los nucleótidos de adenina (ATP y ADP) en las plaquetas existen en dos compartimientos: el pool almacenado (secretable) dentro de los gránulos densos y el pool metabólico (citoplasmático) fuera de los gránulos. El contenido de los tres tipos de gránulos es liberado por las plaquetas activadas debido a la unión de los agonistas a sus receptores específicos sobre estas células. La liberación de estas sustancias almacenadas como por ejemplo el ADP y la serotonina causan el reclutamiento de plaquetas adicionales para la formación del trombo plaquetario (238).

Se conocen desórdenes adquiridos y heredados de los mecanismos de almacenaje y de secreción. Pacientes con estos desórdenes sufren complicaciones con sangramientos (180). Los tres tipos de procesos de secreción dependen de la disponibilidad celular de ATP y van acompañados por aumento de calcio, fosforilación de proteínas y aumento del metabolismo de polifosfoinosítidos. La trombina, el colágeno y el ionóforo de cationes divalentes A-23187 inducen los tres tipos de procesos secretorios, mientras que el ADP, la epinefrina, y el TxA<sub>2</sub> pueden estimular solamente la secreción de los gránulos densos y la de los gránulos alfa (61).

### ***Aspectos de la regulación de la función plaquetaria***

La activación plaquetaria y sus efectos pueden ser modulados por varias sustancias reguladoras, de las cuales la más importante es el AMP cíclico (AMPc). El aumento de AMPc causa un número específico de cambios en la función plaquetaria, incluyendo la reducción de la unión del agonista (180), la alteración de la hidrólisis de los

fosfoinosítidos (308) y una acelerada captación del calcio por el sistema tubular denso, por medio de la activación de una proteína quinasa (288).

La captación del calcio por el sistema tubular denso media la fosforilación de un sistema de bombeo de calcio dependiente de ATP, que remueve el calcio del citosol. Por lo tanto, el AMPc inhibe la adhesión, la agregación, la secreción y el cambio de forma de la plaqueta. Este AMPc se forma en las plaquetas a partir del ATP, a través de una reacción catalizada por la enzima adenilato ciclasa (AC). La acción de esta molécula reguladora es fuertemente estimulada por algunas prostaglandinas en las plaquetas y por la prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina) (PGI<sub>2</sub>) en las células endoteliales activadas.

Las plaquetas también contienen fosfodiesterasas que rompen el AMPc en AMP, modulando la concentración de AMPc (93). La principal fosfodiesterasa en las plaquetas es PDE-3A, que es inhibida por GMPc. Por tanto, componentes que incrementen el GMPc también inhiben la activación plaquetaria. Otros puntos de chequeo de la activación plaquetaria existen sobre la superficie de las células endoteliales, que incluyen a una enzima que destruye el ADP (ADP-asa) y la trombomodulina, un fuerte inhibidor de trombina (61).

#### ***Factor von Willebrand (FvW-Ag)***

El FvW es una glicoproteína que es sintetizada por las células endoteliales y por los megacariocitos. Se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales (de donde se libera al plasma tras estimulación por trombina) y en los gránulos alfa de las plaquetas y de los megacariocitos. La actividad antigénica del FvW traduce la concentración total de la molécula, mientras que la actividad biológica traduce su capacidad funcional.

El FvW circula por el plasma unido al FVIII (VIII-FvW), ésta es una asociación no covalente, que parece ser estable en condiciones fisiológicas. Después del daño al vaso sanguíneo, el FvW unido al colágeno subendotelial puede ser inducido a interactuar con el receptor glicoproteico GPIIb sobre las plaquetas. Esta interacción entre FvW y la GPIIb resulta en la adhesión de las plaquetas y la consiguiente activación plaquetaria. El FvW puede unir un segundo receptor sobre las plaquetas, al complejo GPIIb-IIIa (o integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ). La GPIIb-IIIa es el sitio fisiológico para la unión del fibrinógeno durante la agregación *in vitro*, pero en ausencia de fibrinógeno o después

que la concentración local de FvW se incrementa (por la secreción endotelial o plaquetaria), el FvW también puede promover este proceso de agregación plaquetaria (122, 297). Las plaquetas caninas, en contraste con las plaquetas de otras especies, contienen muy poca cantidad de FvW, 1:10 de la cantidad encontrada en las plaquetas humanas (202, 205).

### ***Hemostasia secundaria: Sistema de la coagulación sanguínea***

La sangre contiene un número variado de proteínas plasmáticas, entre éstas los factores de la coagulación y sus inhibidores, los cuales están implicados en una secuencia de interacciones muy controlada, que resulta en la formación de trombina y posteriormente de fibrina (199).

Tradicionalmente se ha dividido al sistema de la coagulación en dos vías 1. la *vía extrínseca* o del factor tisular, en la cual se forma un complejo entre el factor VII, el calcio y el factor tisular (FT) y 2. la *vía intrínseca* o de contacto, en la que tres proteínas plasmáticas, el FXII, quininógeno de alto peso molecular (KAPM) y la precalicreína (PK) forman un complejo sobre el colágeno del subendotelio vascular. Esta división no ocurre *in vivo* porque el complejo factor tisular-FVII es un potente activador de FIX y del FX (199).

### ***Activación de la vía extrínseca y de la vía intrínseca de la coagulación sanguínea***

El proceso de activación de la coagulación es primariamente una secuencia de rupturas proteolíticas en sitios específicos. Todos los factores de la coagulación, excepto el FT unido a la membrana, son proteínas plasmáticas que requieren un paso de activación proteolítica. La activación fisiológica de la coagulación sanguínea es mediada casi exclusivamente por medio de la ruta del FT (167).

La *vía extrínseca* es la principal vía iniciadora de la coagulación sanguínea *in vivo*, la cual implica componentes vasculares y de la sangre, siendo el FT el componente crítico. El FT es una proteína integral transmembrana que funciona como un cofactor para los FVII y FVIIa en la vía extrínseca y para el FV en la vía final común. Se encuentra en menor o mayor medida en todas las células y consiste de tres dominios, el citosólico, el transmembrana y otro extracelular (167). La expresión del FT sobre la superficie de monocitos y macrófagos activados es una función efectora importante en estas células durante la inflamación. Los monocitos aislados de la sangre periférica

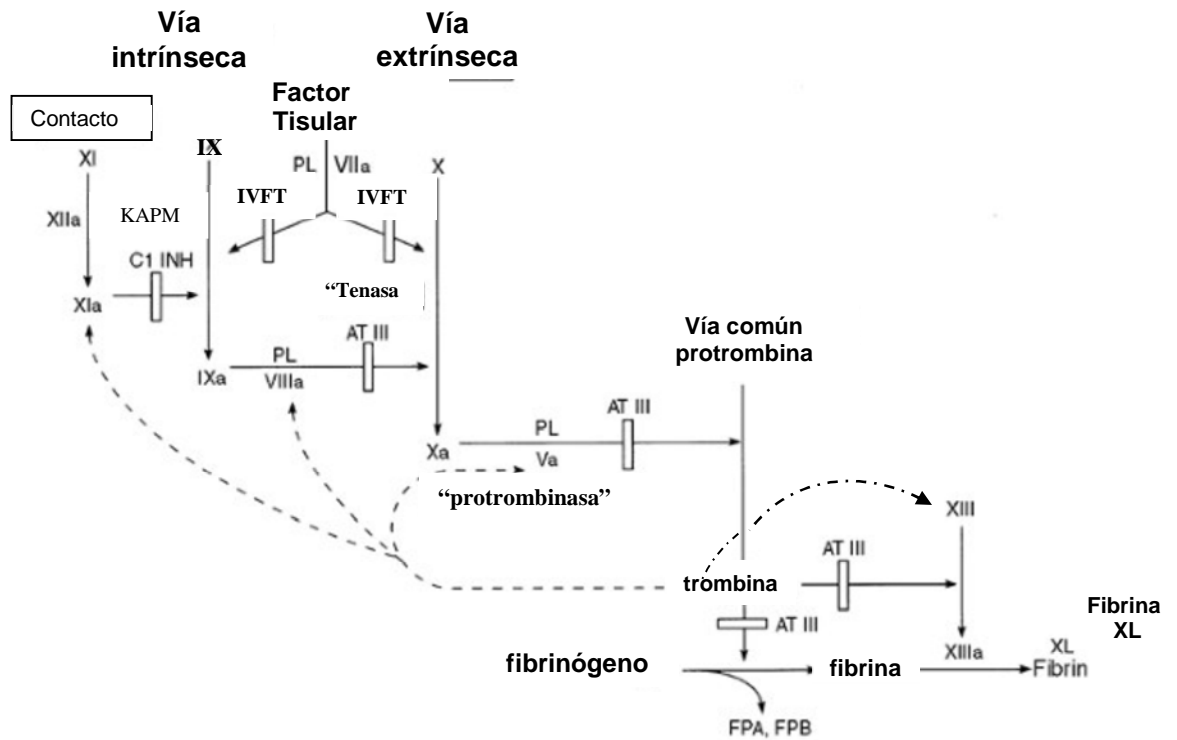
normalmente no tienen niveles detectables de FT, pero expresan esta proteína fuertemente después de la estimulación con endotoxina bacteriana o con ciertos mediadores inflamatorios (48, 104).

Después de un daño vascular, la sangre es expuesta a las células que expresan FT, donde el FT se une con alta afinidad a pequeñas cantidades de FVIIa que se encuentran en la circulación en todo momento. También el FT se puede unir al FVII, el cual se activa a FVIIa. Este complejo tenasa extrínseca (FT-FVIIa) en presencia de calcio, inicia la cascada de la coagulación sanguínea en la hemostasia normal. El complejo FT-FVIIa estimula la cascada de la coagulación de dos maneras (Figura 4). El FT-FVIIa puede activar al FIX. Este FIXa se une con su cofactor, el FVIIIa, lo que ocurre sobre una superficie de fosfolípidos, para junto con el calcio formar el complejo tenasa intrínseco FIXa-FVIIIa, este último, a su vez, une al FX, activándolo a FXa (261).

Alternativamente el complejo FT-FVIIa puede activar directamente también al FX. Una vez activado el FX, por una u otra vía, forma un complejo con el FVa (FXa-FVa) (complejo protrombinasa) en la superficie de fosfolípidos de las plaquetas y unen al FII para formar la trombina (FIIa), la cual actúa sobre el fibrinógeno generando monómeros de fibrina, que se polimerizan para formar el coágulo (261). El complejo FVIIa-FT es inhibido por el inhibidor de la vía del FT (IVFT).

Posteriormente el FXIII es activado por la trombina que se ha generado, pudiendo así formar puentes de glutamil- lisina entre las cadenas laterales de los monómeros de fibrina, solidificando el coágulo de fibrina. La trombina es también capaz de activar al FXI y formar FXIa, el cual va a activar a más FIX a FIXa. Puede la trombina activar también a los cofactores FVIII y FV, al FXIII, al inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), a las plaquetas, a la proteína C y a los receptores de trombina humanos RAP-1, RAP-3 y RAP-4, todos son sustratos naturales de la trombina (261).

La *vía intrínseca* se inicia por componentes completamente contenidos dentro del sistema vascular. Esta vía resulta en la activación del FIX a FIXa, suministrando una ruta independiente del FVII para la coagulación de la sangre. El FXII, KPM y PK son las llamadas proteínas del sistema de contacto, a las que hoy en día se les da menos importancia en el inicio de la coagulación, aunque desempeñan un papel importante en



**Figura 4. Cascada de la coagulación** (Tomado de Sedano y Florez) (261)

- activación directa       $\longrightarrow$
- otras activaciones       $\dashrightarrow$
- IVFT (inhibidor de la vía del FT)
- FT (factor tisular)
- FPA y FPB (fibrinopéptido A, fibrinopéptido B)
- PL (fosfolípidos plaquetarios)
- AT III (antitrombina III)
- Tenasa (sistema IXa-VIIIa + X)
- Protrombinasa (sistema Va-Xa + protrombina)

el crecimiento y mantenimiento del coágulo. La finalidad de ambas vías es la activación del factor X, necesaria para la transformación de protrombina en trombina, precisando también la presencia de fosfolípidos y calcio (261).

La trombina transforma al fibrinógeno en fibrina, con una estructura biológica tridimensional compleja que requiere ser modificada covalentemente por el FXIIIa para que funcione efectivamente durante la hemostasia y el sellado de heridas) (261). El FXIIIa entrecruza covalentemente moléculas de fibrina unas con otras y une un inhibidor anti - plasmina  $2\alpha$  ( $2\alpha$ -AP) y otras moléculas a la fibrina para regular la barrera resistente a proteasas y mecánicamente elástica ante la pérdida de sangre (116). La estabilización de la fibrina es necesaria para una hemostasia efectiva. Las pruebas de coagulación de despistaje (TP, TTPa, TT), rinden resultados normales en presencia de una deficiencia de FXIII (261).

Aunque el proceso de coagulación sanguínea ha sido descrito como una serie de acciones proteolíticas secuenciales, sin embargo, la naturaleza de la hemostasia es quizás mejor describirla como un proceso complejo e interconectado que funciona con un umbral limitado e incluye a eventos celulares, bioquímicos y físicos (151). Nuevos datos han suministrado evidencia para un modelo de hemostasia basado en células, el cual enfatiza la importancia de receptores celulares específicos para las proteínas de la coagulación (167).

Según el modelo reciente sobre la fisiología de la coagulación sanguínea, la coagulación no ocurre como una cascada sino en tres fases que se solapan entre sí. La fase 1 (iniciación) ocurre sobre una célula portadora de FT, por ejemplo, monocitos activados. Esta unión resulta en la formación de FIXa y FXa y posiblemente pequeñas cantidades de trombina. Esta fase es rápidamente apagada por el inhibidor vascular del Factor Tisular (IVFT). En la fase 2 (amplificación) las plaquetas y los cofactores FV y FVIII son activados con el propósito de permitir la generación de trombina a gran escala. En la fase 3 (propagación) grandes cantidades de trombina son generadas sobre la superficie plaquetaria. Esto conduce también a la activación de FXI, el cual está disponible en la fase fluida, aunque también es liberado de las plaquetas. La superficie de las plaquetas activadas protege al FXIa de la inhibición por la proteasa nexina 2. El FXIa puede inducir la formación explosiva de la trombina por la activación mas

eficiente de FIX sobre la superficie plaquetaria. Obviamente, una formación masiva adicional de trombina por medio de esta via ocurre cuando la fibrina ya ha sido formada (Kolde, 2004).

### ***Sistema de la Fibrinólisis***

La lisis del coágulo y la reparación del vaso comienzan inmediatamente después de la formación del tapón hemostático definitivo. La plasmina se encuentra en forma de precursor inactivo, el plasminógeno. Cuando la fibrina ya no es necesaria se activa el sistema fibrinolítico, convirtiendo la fibrina en sus productos de degradación solubles, mediante la acción de la enzima plasmina (123). Su acción es coordinada a través de la interacción de activadores, zimógenos, enzimas, inhibidores, y receptores para proveer la activación local en el sitio de deposición de la fibrina (197).

Los dos activadores fisiológicos del plasminógeno más importantes son, el activador tisular del plasminógeno (APt) y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (APu), ambos son precursores de serin-proteasas y requieren un paso de activación proteolítica. El APt, principal activador fisiológico, difunde desde las células endoteliales y convierte el plasminógeno absorbido en el coágulo de fibrina, en plasmina (143, 294).

Una vez activada la plasmina, degrada entonces al polímero de fibrina entrecruzada y libera productos de degradación de la fibrina (PDF) de diferentes tamaños moleculares, los más pequeños son los fragmentos D y E. Un producto importante de esta degradación, desde el punto de vista diagnóstico, es el Dímero-D, el más pequeño de una serie de PDFs entrecruzados por el FXIIIa (61).

La plasmina también rompe al fibrinógeno, el cual genera productos de degradación de fibrinógeno, como fragmento X, fragmento Y y productos mas pequeños. Algunos de éstos alteran la agregación plaquetaria y la polimerización de la fibrina y, funcionan como anticoagulantes (167). Aunque la plasmina puede degradar también al fibrinógeno, esta reacción permanece localizada por las diferentes moléculas inhibitoras que inactivan a las proteasas activadoras del sistema fibrinolítico (186).

El principal inhibidor fisiológico de la plasmina es la alfa<sub>2</sub>-antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP), que reacciona rápidamente con la plasmina en el plasma e inhibe irreversiblemente a la enzima para formar un complejo bimolecular estable. En el proceso, la  $\alpha_2$ -antiplasmina

es parcialmente degradada por la plasmina. También el FXIII entrecruza a la  $\alpha_2$ -antiplasmina con la fibrina, haciendo a la fibrina más resistente a la degradación de la plasmina y contribuye a un incremento de la resistencia a la lisis del coágulo de fibrina entrecruzada.

Otros inhibidores del sistema fibrinolítico comprenden la  $\alpha_2$ -macroglobulina, el inhibidor del activador tisular del plasminógeno 1 (IAP-1 o PAI-1), el inhibidor de C1, glicoproteína rica en histidina (GRH), inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (IFAT o TAFI) y lipoproteína a (Lpa) (197). Tanto APt como APu son eficientemente inhibidos por  $\alpha_2$ -antiplasmina e IPA-1 (31).

Incrementadas concentraciones de dímero-D sobre el valor basal indican formación excesiva de fibrina, estabilización por el FXIIIa y su lisis subsiguiente por la plasmina y ésto a su vez equivale a la activación de la coagulación y de la fibrinólisis. Por este motivo el dímero-D es considerado en hemostasia un marcador de activación de la fibrinólisis, por tanto un elevado nivel de dímero-D indica hiperfibrinólisis (167).

En la Tabla I se observan los rangos de referencia de algunos valores hematológicos y de la coagulación sanguínea en perros.

### ***Mecanismo patológico de la hemostasia***

Cuando se altera uno de los cuatro componentes hemostáticos: vasos sanguíneos, plaquetas, coagulación y fibrinólisis, aparecen enfermedades hemorrágicas o tromboembólicas (245). Las plaquetas juegan un papel central en la hemostasia primaria, por esta razón las alteraciones hemostáticas hemorrágicas más comunes implican a las plaquetas, ya sea solas o en combinación con otros sistemas hemostáticos (274).

Los trastornos hemostáticos pueden clasificarse por conveniencia como hereditarios o adquiridos. Alternativamente pueden clasificarse en función del mecanismo del defecto. Dentro de los trastornos adquiridos, las trombocitopenias son con mucho, las entidades más frecuentemente encontradas (263).

### ***Alteraciones de la hemostasia primaria***

#### ***Desórdenes en los vasos sanguíneos***

La sintomatología clínica usual de estos defectos es la tendencia a formar hematomas o el sangramiento espontáneo, especialmente de la superficie de las mucosas. Existen desórdenes vasculares hereditarios y adquiridos. Entre las anomalías



**Tabla I. Valores de referencia de la hematología y de la coagulación sanguínea en caninos**

Variables	Rangos	Unidades
hemoglobina	12-18 <sup>a</sup>	g/dL
hematocrito	37-55 <sup>a</sup>	%
plaquetas	200-500 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	/μL
hemoglobina corpuscular media (CHCM)	32-36 <sup>a</sup>	g/dL
leucocitos	6 a 17 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	/μL
neutrófilos	3 a 11,5 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	/μL
linfocitos	1 a 4,8 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	/μL
monocitos	0,2 a 1,4 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	/μL
eosinófilos	0,1 a 1,3 x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	/μL
concentración de Fibrinógeno	200-400 <sup>a</sup>	mg/dL
tiempo de protrombina	5-9 <sup>b</sup>	s
tiempo de tromboplastina parcial activada	10,8-13,5 <sup>b</sup>	s
factor von Willebrand (FvW)	normal = 70 a 180 <sup>c</sup> , anormal:0-49 <sup>c</sup>	%
	en el límite de lo normal = 50 a 69 <sup>c</sup>	%
agregación plaquetaria en sangre total (5μg/mL colágeno)	10-12 <sup>c</sup>	Ω
secreción de ATP (1 U/mL de trombina)	1,6-1,8 <sup>d</sup>	nmol
secreción de ATP (5μg/mL de colágeno)	0,8-1 <sup>d</sup>	nmol
sec. de ATP/10 <sup>11</sup> plaquetas (1 U/mL trombina)	1,3 ± 0,4 <sup>e</sup>	μmol/ 10 <sup>11</sup>
concentración de dímero D	150-450 <sup>f</sup>	ng/mL
tiempo de lisis de euglobulina	90-300 <sup>a</sup>	min

<sup>a</sup> = Schalm *et al.*(258) <sup>b</sup> = Lewis (184) <sup>c</sup> =Brooks (41), <sup>d</sup> = Grauer *et al.*(113) <sup>e</sup> = Juttner *et al.*(156) <sup>f</sup> = Meyers *et al.* (204) <sup>g</sup> = Tarnow *et al.* (207)

adquiridas se encuentran: 1. Púrpura alérgica, asociada con alergia alimentaria, medicamentosa, tóxica, infecciosa y por frío. 2. Paraproteinemia y amiloidosis, debido a deposición de estos compuestos en el endotelio y aparente infiltración perivascular, asociada a hemorragia. 3. Deficiencia de vitamina C, con disminución de la síntesis de colágeno y debilitamiento de las paredes de los capilares y 4. Púrpura sicogénica, con sangramiento cutáneo (239).

### ***Desórdenes de las plaquetas***

La función plaquetaria puede estar alterada en muchas condiciones clínicas en medicina canina, así, se ha reportado activación plaquetaria en presencia de parásitos intravasculares, en rickettsias como *A. platys* y *E. canis*, por vasculítis y en infecciones virales. Por otra parte, la infección con *E. canis* se acompaña de hemorragias, con o sin la presencia de trombocitopenia, lo que hace sospechar de una alteración plaquetaria asociada a rickettsias (295). Los desórdenes plaquetarios pueden ser divididos en dos grandes categorías: alteraciones en el número de plaquetas (cuantitativas), o alteraciones de la función plaquetaria (cualitativas), siendo también de tipo congénito o adquirido (268).

### ***Alteraciones en el número de las plaquetas***

#### ***Trombocitopenia***

Se define como un recuento de plaquetas menor de 200.000/ $\mu$ L ( $200 \times 10^9$  L) en perros. Es la causa más común de sangramiento encontrada clínicamente. Las alteraciones plaquetarias se manifiestan principalmente por una hemorragia excesiva en localizaciones mucocutáneas, con petequias (3mm), equimosis (3cm), púrpura (1cm), epistaxis, hemorragia gingival y menorragia, más frecuentemente (107).

Tanto las alteraciones cualitativas como las cuantitativas de las plaquetas pueden producir estos síntomas, siendo necesario excluir la trombocitopenia mediante la realización de un recuento de plaquetas. Las infecciones con rickettsias suelen cursar con trombocitopenia, la infección sistémica es la causa más común de trombocitopenia, pudiendo presentarse en el curso de infecciones por virus, micoplasma, micobacterias ehrlichiosis y malaria. La trombocitopenia representa una de las causas más comunes de sangramiento espontáneo en perros. El rango de referencia del recuento de plaquetas en sangre periférica de perro está entre 200.000 - 500.000/ $\mu$ L. Múltiples mecanismos

pueden contribuir al desarrollo de la trombocitopenia. La trombocitopenia puede ser causada por disminución de la producción de las plaquetas, aumento de la destrucción o del secuestro de las plaquetas o incremento en la utilización de las mismas. La disminución de la síntesis de plaquetas puede ocurrir secundaria a varios desórdenes, como la anemia aplásica, enfermedad mieloproliferativa, mielofibrosis, neoplasia metastásica, drogas, toxinas, e infecciones (218).

Por otra parte, el aumento de la destrucción y secuestro de plaquetas de la circulación puede ser inmunitario y no-inmunitario. Cuando la trombocitopenia es mediada inmunitariamente (TMI), la causa puede ser primaria, como lo es la trombocitopenia autoinmune (desorden en el cual se desarrollan autoanticuerpos contra la tromboxetina o contra los megacariocitos) o secundaria a infecciones bacterianas o virales, neoplasia o drogas. Esto implica a mecanismos que resultan en el aumento de la cantidad de inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina M (IgM), y/o complemento unido a las plaquetas. La causa más común de destrucción acelerada de las plaquetas es la deposición de inmunoglobulinas sobre la superficie de las plaquetas (238).

La unión del anticuerpo a la plaqueta puede inducir varios efectos, destrucción acelerada, lisis celular, activación plaquetaria, agregación, secreción del contenido de los gránulos y expresión de la actividad del FP3. Esta interacción plaqueta-anticuerpo puede conducir, por tanto, a función alterada de la plaqueta, como consecuencia de la activación provocada por la unión de anticuerpos a glicoproteínas específicas plaquetarias. Las plaquetas pueden unir complejos inmunes mediante sus receptores Fc y, la activación del sistema del complemento (c5-b9) sobre su superficie celular puede contribuir a la activación plaquetaria (238).

El impacto global de los anticuerpos puede ser la trombocitopenia y/o disfunción plaquetaria, como ha sido observado en muchos pacientes que padecen enfermedades autoinmunes, como la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) y el lupus eritematoso sistémico (LES), en donde se han detectado anticuerpos dirigidos contra glicoproteínas plaquetarias (GPs). Estas GPs funcionan como receptores, GPIb (284, 317), GPIIb-IIIa (24, 317), GPIa-IIa (76, 81), GPIV (236), GPVI (35, 280). En algunos pacientes, el anticuerpo bloquea específicamente la agregación plaquetaria inducida por colágeno, solo a través de la interacción con GPVI (280), GP IV (236), o GPIa-IIa (81). Boylan

*et al.* (35) reportan que el anticuerpo anti GPVI indujo una depuración del complejo GP VI-FcR de la superficie plaquetaria. Se ha reportado que los pacientes con PTI tienen disminuida la sobrevivencia plaquetaria, con incremento de IgG asociada a plaqueta (IgGAP) en la mayoría de los pacientes (38, 162).

En pacientes con TMI también se ha observado un incremento de la velocidad de la trombocitopoyesis, lo que ha hecho sugerir que estos pacientes tienen plaquetas jóvenes en circulación con una capacidad funcional aumentada. Sin embargo, estos pacientes con PTI pueden tener función plaquetaria alterada (57), tiempos de sangría anormalmente prolongados y recuentos adecuados de plaquetas.

La trombocitopenia no mediada inmunitariamente puede ser secundaria a mordeduras de serpientes, toxinas o drogas (218). Un incremento en la utilización o consumo de las plaquetas circulantes puede causar trombocitopenia. Este uso puede ser apropiado, como es el caso de un trauma masivo o hemorragia externa, siendo la trombocitopenia que se produce, de leve a moderada, la cual es rápidamente reversible sin terapia específica.

El uso de las plaquetas también pudiera ser inapropiado, como en el caso de una activación localizada o sistémica de los mecanismos hemostáticos, esta activación patológica causa isquemia microvascular y disfunción orgánica severa (203). Lo anterior ocurre en la coagulación intravascular diseminada (CID) aguda, la cual puede ser secundaria a diferentes enfermedades. El mecanismo fisiopatológico común que resulta en una CID, donde el consumo de plaquetas es rápido, produce trombocitopenia severa (227).

Un aspecto clínico de la interacción plaqueta – endotelio puede verse en pacientes con trombocitopenia. Cuando las plaquetas caen precipitadamente dentro de los valores críticos (10.000 a 20.000) se inicia la desorganización molecular, abriendo rápidamente las uniones intercelulares del endotelio, causando extravasación de los eritrocitos hacia los tejidos circundantes en ausencia de trauma manifiesto (154, 299). Adelgazamiento marcado y atenuación del endotelio, con separación de los intersticios endoteliales ha sido observado en animales con trombocitopenia (166).

### ***Trombocitosis***

Consiste en el aumento del número de plaquetas por encima de 500.000/ $\mu$ L en

sangre total. En la mayor parte de los casos es secundaria a inflamación o traumas, siendo llamada trombocitosis reactiva (275). Las tres principales causas de trombocitosis son 1) clonal, incluyendo la trombocitopenia idiopática (o primaria) y otros trastornos mieloproliferativos, 2) familiar, incluyendo casos raros de mieloproliferación no clonal por mutaciones de la trombopoyetina y 3) reactiva, en la que la trombocitosis se produce de forma secundaria a una variedad de procesos clínicos agudos y crónicos (257).

#### ***Alteraciones de la función de las plaquetas (trombocitopatías)***

Un tiempo de hemorragia prolongado en un paciente que posea un número normal de plaquetas es indicativo de una alteración cualitativa de las plaquetas (60).

#### ***Desórdenes de la adhesión plaquetaria***

Pueden ser de tipo hereditario, producto de la ausencia de GPIb y/o disminución o alteración del FvW, o, de tipo adquirido, producto de la administración de drogas (la más común), por la presencia de anticuerpos antiplaquetas o debida a enfermedades hepáticas crónicas. Ambos tipos resultan en alteración de la adhesión y en desórdenes hemorrágicos típicos de una función plaquetaria anormal (268).

#### ***Desórdenes en la agregación primaria de las plaquetas***

Son desórdenes raros y están asociados a deficiencia o alteración de la GP IIb/IIIa, la cual funciona como receptor para el fibrinógeno, FvW y fibronectina. También pueden presentarse por ausencia o disminución severa del fibrinógeno plasmático (afibrinogenemia) (60).

#### ***Desórdenes en la secreción plaquetaria (agregación secundaria)***

Los desórdenes en la secreción plaquetaria están generalmente asociados con una onda secundaria de agregación plaquetaria anormal. Son más comunes que los desórdenes de la agregación primaria. En un trazado de agregación normal, el reactivo de ADP causa activación de la plaqueta, contracción de sus organelos y liberación de su contenido, incluyendo el ADP almacenado en los gránulos densos. El ADP entonces induce la agregación secundaria (60). En desórdenes de la secreción, el ADP de los gránulos no es liberado, y consecuentemente las plaquetas activadas inicialmente vuelven a su forma original, ocasionando que el trazado regrese a su línea base (64). Estos desórdenes de la secreción se producen por medio de dos mecanismos. El primero es la existencia de niveles disminuidos del contenido de los gránulos densos ( $\delta$ )

y de los gránulos alfa, conocido como “deficiencia del depósito de almacenaje”. En éstos las plaquetas llegan a ser activadas normalmente, pero la cantidad del contenido de los organelos es inadecuada para soportar la agregación posterior (64).

El segundo mecanismo se presenta cuando el depósito de almacenaje normal de plaquetas no se está liberando totalmente, ya que hay un defecto en el mecanismo de activación plaquetaria, tal como producción alterada de prostaglandinas o una respuesta bioquímica inadecuada a la movilización de calcio o tromboxano. Existen también defectos hereditarios y adquiridos en las enzimas fosfolipasas de la vía del ácido araquidónico (AA), en la vía de las prostaglandinas (ciclooxigenasa, tromboxano sintetasa) (275).

#### ***Alteraciones del Factor Von Willebrand (FvW)***

Cuando hay daño al endotelio, el Factor von Willebrand se libera (296). Los niveles de este factor se incrementan en pacientes con enfermedad vascular inflamatoria como ocurre en las enfermedades causadas por rickettsias (*R. rickettsii* y *R. conorii*) (23, 177). Se acepta, por tanto, que este factor puede secretarse al torrente sanguíneo en respuesta al daño endotelial de cualquier origen (235), por lo que podrían aumentar los niveles plasmáticos del mismo en caso de vasculitis.

Por otra parte, se ha reportado que el FvW es una glucoproteína que contiene ácido siálico en sus extremos y puede llegar a perder el ácido siálico por acción de la enzima sialidasa, modulándose de esta manera, su función y su estabilidad (vida media) en circulación (303). Grewal *et al.* (117) trabajando con ratones han reportado que en enfermedades infecciosas, como en el caso de infecciones por *streptococcus pneumoniae*, la enzima sialidasa de este microorganismo libera el ácido siálico del FvW (117).

El FvW sin el ácido siálico (asialoglicoproteína) puede unirse a los receptores de los hepatocitos, conocidos como receptores Ashwell (ASGPR'S), los cuales son una de las muchas lectinas que unen asialoglicoproteínas. ASGPR'S están implicados en la unión y endocitosis de varias glicoproteínas. La desasilación del FvW hace que disminuya su vida media en el plasma, disminuyendo su concentración (117). De la misma forma, este tipo de microorganismos también puede eliminar el ácido siálico de las GP de la superficie de las plaquetas, pudiendo ser captadas estas células rápidamente

por el mismo receptor hepático, siendo causa de la trombocitopenia observada en esta infección. Estos autores observaron que la causa de la trombocitopenia en esta sepsis no fue el desencadenamiento de CID y por lo tanto el depósito de fibrina intravascular y el consumo de plaquetas en los trombos, si no la endocitosis hepática antes mencionada. Inclusive se ha descrito que la captación aumentada del FvW y de las plaquetas por el hígado evitó la formación de CID en esta infección (87).

La concentración plasmática del FvW puede también variar a causa de la enfermedad de von Willebrand (EvW), un desorden de la molécula de FvW. Generalmente hay una deficiencia del FvW o su actividad funcional es anormal en pacientes con este desorden. La unión del FvW a receptores específicos sobre la membrana plaquetaria y sobre la superficie endotelial está alterada.

La falta de adherencia plaquetaria a la pared de los vasos dañados es el defecto principal de la EvW y resulta en un tiempo de sangría prolongado. Los signos clínicos varían marcadamente. Los perros afectados pueden tener o no mínimas a marcadas hemorragias. Sin embargo el número y función de las plaquetas son normales en esta enfermedad (227).

Ademas del tiempo de sangría, existen otras pruebas específicas para determinar defectos del FvW como son: análisis de multímeros del FvW, determinación de la actividad del cofactor de la ristocetina y botrocetina, actividad de unión al colágeno, aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) y cuantificación de la actividad coagulante del FVIII (109, 189).

Los trastornos de este factor se pueden clasificar en: Tipo 1: es el mas común, se caracteriza por la presencia de un FvW con estructura y función normales pero con disminución de su cantidad, disminución concordante de la actividad del FVIII y actividad del cofactor de ristocetina. Tipo 2: estructura y función alteradas, es heterogéneo y se divide en 4 subtipos (2A, 2B, 2N, y 2M). 2B se asocia con disminución de los multímeros de alto peso molecular, como resultado de un incremento de la afinidad del FvW a la GPIb. Tipo 2N con defectos de la unión del FvW al FVIII y se asocia con una disminución de media a moderada de FVIII. Tipo 2M se asocia con disminución de la función plaquetaria sin afectar a los multímeros de alto peso molecular. Tipo 3: niveles bajos, casi no detectables de FvW (109).

Las hemorragias son principalmente cutáneo-mucosas. En ocasiones puede haber sangrados gastrointestinales y, más raramente hemartrosis o hematomas musculares. En las exploraciones complementarias se descubre un alargamiento del tiempo de sangría, sin embargo el TTPa se alargará sólo en los casos en que también esté disminuido el FVIII.

La enfermedad de von Willebrand adquirida es una enfermedad hemorrágica poco común. Se debe principalmente a la generación de autoanticuerpos. Aproximadamente en la mitad de los casos se asocia con enfermedades linfoproliferativas y también se ha relacionado con trastornos mieloproliferativos, neoplasias, enfermedades inmunológicas, cardiovasculares y otras condiciones clínicas. En la mayoría de los pacientes el FvW se sintetiza normalmente, sin embargo, es rápidamente removido del plasma a través de diferentes mecanismos, cuyo resultado final común es la disminución de los niveles circulantes de este factor (78).

#### ***Alteraciones de la hemostasia secundaria: Desórdenes de la coagulación sanguínea***

La tendencia al sangrado debida a las deficiencias hereditarias de uno o mas factores de la coagulación son enfermedades que, aunque infrecuentes, están mundialmente distribuidas. Los pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos para los genes mutados responsables de estos defectos, presentan manifestaciones hemorrágicas de gravedad variable y, normalmente relacionadas con la intensidad de la disminución de la actividad del factor de coagulación en concreto. Los heterocigotos para varias de estas deficiencias presentan, de forma poco frecuente, tendencia al sangrado. Se han identificado numerosas mutaciones en los genes que codifican los factores de la coagulación.

En perros se han reportado deficiencias de los factores de la coagulación, en especial en las razas puras. En la mayoría de los casos los desórdenes se deben a deficiencias en un solo factor, sin embargo deficiencias heredadas de factores múltiples han sido reportadas en perros. Las deficiencias heredadas de los factores I, II, VII, VIII, IX, X, XI y XII, así como también de precalicreína, han sido identificadas en perros. Las deficiencias de los factores V, XIII, quininógenos de alto peso molecular, y Factor Tisular no han sido reportadas en animales (42, 88). Como regla general las deficiencias de los factores de contacto son subclínicas y solo se detectan durante los ensayos de la



coagulación. Las deficiencias del FVII o del FXI tienden a causar enfermedad moderada, con pocos problemas de sangramiento, presentándose generalmente cuando un estrés adicional es aplicado sobre el sistema hemostático (cirugía, trauma severo). En la mayoría de las colonias de perros de investigación animal la deficiencia del FVII ha sido detectada accidentalmente, ya que no presentaban ningún tipo de sintomatología (47).

Las hemorragias persistentes ocurren generalmente en pacientes con una deficiencia del FXI post-cirugía. Los pacientes con deficiencias heredadas de los Factores IX y VIII de la vía intrínseca, así como de los Factores X, II y I de la vía común, tienen las coagulopatías más severas. Además las deficiencias de los factores I, II y X son raras en animales (227). El grado de hemorragia va de moderado a severo, dependiendo de una variedad de mecanismos compensatorios hemostáticos, además de la severidad propia de la deficiencia real del factor (42).

La deficiencia del FVIII (hemofilia A) es el defecto más común, presentándose en la mayoría de las razas de perros. Se hereda como un desorden recesivo ligado al cromosoma X. La enfermedad ocurre casi exclusivamente en machos homocigotos. Las hembras heterocigotas son portadores asintomáticos. La deficiencia del FIX (hemofilia B) es otro desorden recesivo ligado al cromosoma X, pero menos común, aunque ha sido reportada en quince razas de perros. El desorden de sangramiento hereditario más común es la enfermedad de Von Willebrand, con más de 50 razas de perros afectadas (43, 79, 153).

En ciertas enfermedades, una activación inespecífica de la coagulación sanguínea puede ser mediada por una variedad de proteasas, de microorganismos, de células tumorales, de leucocitos o liberadas del tejido dañado. Esta activación da lugar a desórdenes adquiridos en los niveles y en la función de los factores de la coagulación (263). Entre los defectos adquiridos se encuentran CID, enfermedad renal, deficiencia de vitamina K, estados de malabsorción, anticoagulantes (cumarínicos), inhibidores (anticuerpos anti-factores) (275).

El hígado juega un papel central en la hemostasia, ya que en sus células se sintetizan muchos factores de la coagulación, así como muchos de los inhibidores fisiológicos de la coagulación (Proteína C, Proteína S, Antitrombina III) y componentes

esenciales del sistema fibrinolítico. Las enfermedades hepáticas se asocian frecuentemente con trastornos hemostáticos, que pueden conducir a manifestaciones hemorrágicas espontáneas y relacionadas con lesiones (218).

Además de la función del fibrinógeno (Factor I) en la formación del coágulo, esta proteína juega un importante papel en la activación plaquetaria y en la agregación, por unión a la GPIIb-IIIa. Se sabe que el incremento de los niveles de fibrinógeno puede compensar el déficit de plaquetas y restaurar la función hemostática. El papel compensatorio del fibrinógeno en la trombocitopenia ha sido sugerido en datos experimentales *in vitro*. Se ha reportado también que el efecto de sustancias bloqueadoras de los receptores sobre la superficie plaquetaria puede ser antagonizado por un incremento de las concentraciones de fibrinógeno plasmático (185).

Así mismo, cuando el fibrinógeno es añadido a muestras de plasma con diferentes recuentos plaquetarios ( $10 \times 10^3/\text{mm}^3$ ,  $50 \times 10^3/\text{mm}^3$  y  $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) la fuerza del coágulo se incrementa a medida que se incrementan los niveles de fibrinógeno añadidos a cada muestra plasmática. Del mismo modo, en muestras con el mismo contaje de plaquetas, pero con diferentes niveles de fibrinógeno, la contribución de las plaquetas a la fuerza del coágulo fue incrementada con un patrón fibrinógeno dependiente (176).

El beneficio del papel compensatorio de las altas concentraciones de fibrinógeno ha sido demostrado en pacientes de obstetricia, donde la concentración de fibrinógeno usualmente se incrementa entre 50 y 250% (112). Se piensa que la elevación del fibrinógeno es beneficiosa en cuanto a la disminución de la pérdida de sangre durante el parto, debido a que fallos en la elevación de la concentración de fibrinógeno se asocian con severos sangramientos. Niveles plasmáticos de fibrinógeno menores de 200 mg/dL tienen 100% de valor predictivo para la hemorragia postparto (55).

#### ***Alteraciones del sistema fibrinolítico***

El aumento de la fibrinólisis debido a una pérdida congénita o adquirida de la actividad del inhibidor de la fibrinólisis, se asocia con una diátesis hemorrágica (123). Los desórdenes de hipocoagulabilidad resultan de un exceso de activadores de plasminógeno, por varios tejidos del cuerpo o por el endotelio vascular, como ocurre en la fibrinólisis primaria y en la CID. Los desórdenes fibrinolíticos pueden ser heredados o adquiridos (mas comunes). Los desórdenes fibrinolíticos adquiridos asociados con

sangramientos debidos a hiperfibrinólisis incluyen, enfermedad hepática, coagulopatía por consumo, leucemia promielocítica aguda, menorragia, amiloidosis, daño tisular y celular inducido por drogas, hiperviscosidad causada por proteínas anómalas, pudiendo permitir trombosis en capilares (94, 254).

Los trastornos de la generación de plasmina, ya sea por déficit parcial de plasminógeno o actividad funcional disminuida del mismo, así como las alteraciones en la liberación del activador del plasminógeno de la pared del vaso y el aumento en la inhibición del activador tisular del plasminógeno, por aumento del inhibidor del activador del plasminógeno IAP-1, pueden favorecer las trombosis (17).

Las alteraciones más características de la activación fibrinolítica sistémica en las pruebas de laboratorio, son: acortamiento del tiempo de lisis del coágulo total diluido y de las euglobulinas (por aumento de los activadores, especialmente de AP-t), aumento de los PDF circulantes y descenso simultáneo del plasminógeno y de la  $\alpha$ -2-antiplasmina (17).

El hallazgo de los dímeros D circulantes apoyaría que la fibrinólisis es secundaria a la formación de fibrina intravascular. Hemorragias localizadas en algunas áreas u órganos pueden relacionarse con aumento de activadores fibrinolíticos y activación fibrinolítica localizada, sin evidencia de cambios a nivel de sangre sistémica (254). La fibrinólisis secundaria en coagulopatía por consumo está representada por la activación fibrinolítica típicamente vista en CID (94).

La CID es una de las coagulopatías más comunes en medicina veterinaria y puede presentarse secundaria a diferentes enfermedades, entre ellas las infecciones bacterianas, asociadas a trombosis microvascular. Uno de los mecanismos desencadenantes es el daño endotelial. La patogénesis de la CID se relaciona primariamente con una generación de trombina mediada por aumento del factor tisular (FT), con concurrente disfunción de los mecanismos inhibitorios, resultando en excesiva deposición de fibrina, consumo de los factores de la coagulación y de las plaquetas (trombocitopenia) (182).

El sistema fibrinolítico es activado como un mecanismo compensatorio pero puede ser insuficiente, debido a la respuesta pro-fibrinolítica inicial que es acompañada por un incremento sostenido del IAP-1 (289). La activación del TAFI por la generación

aumentada de trombina puede posteriormente alterar la activación fibrinolítica. La activación fibrinolítica local es reflejada por aumento de los niveles plasmáticos de PDF y niveles reducidos de plasminógeno y  $\alpha$ 2-antiplasmina, reflejando su consumo. Cuando los complejos plasmina-antiplasmina aumentan las pruebas de medición global de la fibrinólisis como por ejemplo la del tiempo de lisis del coágulo de euglobulina, pueden estar acortadas. Inhibidores como  $\alpha$ 2-macroglobulina, Inhibidor C1, pueden estar reducidos en CID severa, y niveles plasmáticos de IAP-1 están aumentados, particularmente en sepsis. Todas estas manifestaciones de hiperfibrinólisis pueden reflejar liberación exagerada de APt desde la célula endotelial causando desorden hemorrágico sin los eventos trombóticos iniciales de los síndromes de CID (262).

Durante la degradación de las fibrinas se forman diferentes fragmentos, uno de ellos es el Dímero D. El epítoto dímero-D es un neoantígeno producido por el entrecruzamiento de cadenas gamma de los dominios D de dos monómeros de fibrina adyacentes, mediado por la acción del FXIIIa (activado por la trombina) y, es expuesto después que la plasmina degrada a la fibrina entrecruzada, permitiendo ser detectado por ensayos inmunológicos. Por tanto, el dímero D representa, tanto la activación de la trombina como de la plasmina, y es específico para la fibrinólisis (278).

#### ***Mecanismos hemostáticos en la TCIC y en otras infecciones rickettsiales***

La trombocitopenia es el defecto de hemostasia primaria adquirido más común y consistente en las enfermedades rickettsiales caninas. El mecanismo de la trombocitopenia rickettsial parece ser complejo y multifactorial y puede variar con la especie de rickettsia infectante. La producción disminuida y/o destrucción aumentada, ya sea inmunitaria o no inmunitaria, están implicadas en la patogénesis de la trombocitopenia por rickettsias (88).

La infección aguda por *E. canis*, al igual que por *A. platys* cursa también con trombocitopenia, debida a varios mecanismos. Estos incluyen aumento del consumo plaquetario, secuestro esplénico (319) y/o aumento de la destrucción plaquetaria asociada con mecanismos inmunomediados, resultando en acortamiento de la vida de las plaquetas circulantes (232, 273), supresión de la producción de plaquetas en la médula ósea, principalmente en la fase crónica (319). La hemofagocitosis puede explicar la trombocitopenia observada en ehrlichiosis (2).

Varios autores han evaluado el componente inmunitario de la destrucción plaquetaria en perros con ehrlichiosis aguda, demostrando presencia de anticuerpos antiplaquetarios en el suero de los perros infectados experimentalmente (305, 306). Gaunt *et al.*(102) y Grindem *et al.* (119) observaron niveles aumentados de anticuerpos asociados a plaquetas (IgGAP) en perros con infección por *E. canis*. Los perros infectados con *E. canis* llegaron a ser trombocitopénicos cuando se estaban produciendo anticuerpos detectables contra *E. canis* (96). También ha sido observada la trombocitopenia inmunomediada en perros infectados experimentalmente con *Babesia gibsoni* (312). El suero de personas infectadas con *A. phagocytophilum* también presentó anticuerpos antiplaquetarios (316). Tanto en las infecciones por fiebre moteada de las montañas rocosas como en la ehrlichiosis, los anticuerpos persisten de semanas a meses, aún con el recuento plaquetario normalizado (119). Estos resultados indican un componente inmunitario para la trombocitopenia rickettsial (86).

La relación de la respuesta inmunitaria del hospedero con el desarrollo de la trombocitopenia en perros infectados con *A. platys* es desconocida. El patrón de respuesta serológica de los perros infectados experimentalmente con *A. platys* es similar al patrón observado en perros infectados con *E. canis*. En la Trombocitopenia Cíclica Canina, la rápida recuperación del recuento de plaquetas post-bacteriemias, asociada con incremento de la trombopoyesis, sugiere un rápido intercambio de plaquetas. En este sentido Kitchensy Weiss (165) han sugerido que el constante recambio de plaquetas en la púrpura trombocitopénica cíclica mejora la integridad vascular. Diversos autores han observado plaquetas gigantes y grandes en los frotis sanguíneos de los perros infectados con rickettsias y han medido el volumen plaquetario medio (VPM) aumentado ( $13,6 \mu^3$ ), siendo el rango normal de  $5,4$  a  $9,2 \mu^3$  (128, 173, 305).

Las células endoteliales son el blanco primario en las infecciones rickettsiales, siendo la adhesión aumentada de las plaquetas al endotelio dañado el principal mecanismo de trombocitopenia en el grupo de enfermedades de la fiebre moteada (86, 237, 270). En relación a esto, Silverman (270) demostró que la *Rickettsia rickettsii* causa daño a células endoteliales cultivadas, este daño también se ha observado *in vivo* en conejillos de indias. La alteración vascular está asociada con el aumento en la

circulación de moléculas almacenadas en las células endoteliales, como el FvW, o proteínas de membrana, tales como la trombomodulina (106, 270).

Tanto *A. phagocytophilum*, agente de la anaplasmosis granulocítica humana, patógeno intracelular obligatorio de los granulocitos neutrófilos (51, 83), como *A. marginale*, que infecta eritrocitos de bovinos (212), invaden líneas celulares endoteliales *in vitro* (rhesus:RF/6A y bovina: BCE C/D-1b), formando inclusiones en cada célula. Lo anterior demuestra que el endotelio microvascular es susceptible a anaplasmas *in vitro*, y puede representar un enlace, que explicaría el desarrollo de la respuesta inmunitaria e infección persistente en estas patologías. El endotelio vascular interactúa con células circulantes *in vivo* y podría estar implicado en la patogénesis y diseminación de los organismos (212).

Infecciones por *A. phagocytophilum* en caballos causa una trombocitopenia cuyo mecanismo no ha sido determinado. *Neorickettsia risticii* agente causal de la ehrlichiosis monocítica equina cursa con desórdenes hemostáticos que incluyen trombocitopenia debida a la activación hemostática sistémica (119).

Por otra parte, en la infección con *E. canis* se han reportado disfunciones plaquetarias, como inhibición de la migración de plaquetas, disminución de la retención media plaquetaria (157), y disminución de la liberación del FP3 desde plaquetas caninas normales, incubadas con suero de perros infectados (232). En la ehrlichiosis crónica, en cambio, se ha reportado aumento de la liberación del FP3 (59).

En *E. canis* se ha observado alteración de la respuesta de agregación plaquetaria al colágeno/epinefrina, a concentraciones finales de 4µg/mL y 5µM/L, respectivamente (126). En otro estudio se observó que los perros con ehrlichiosis presentaron una disminución de la respuesta de agregación a colágeno/epinefrina y ADP/epinefrina entre los días 7-35 post-infección (36). Infecciones con *A. phagocytophilum*, al igual que con *A. platys* han sido asociadas con disfunción plaquetaria (32).

### ***Pruebas de diagnóstico de Anaplasma platys***

#### ***Microscopía óptica***

La observación microscópica directa de extendidos sanguíneos, teñidos con Giemsa, ha sido el método de diagnóstico de referencia más utilizado para la identificación de los organismos rickettsiales como *A. platys* y otros agentes que infectan

al perro. Según French y Harvey (96) no es un método confiable de detección de la infección porque las bacteriemias son cíclicas, y por lo tanto, existirán algunos periodos donde el número de plaquetas está disminuído y, cuando la bacteriemia es baja, se dificulta su detección *in vitro*, por tanto podría darse un resultado falso negativo.

Por otra parte, hay que tener presente que las plaquetas son fragmentos de citoplasma que contienen gránulos alfa y gránulos densos, los cuales toman la coloración basófila al igual que los organismos anaplasmales, por lo tanto podrían estos gránulos coalescer y confundirse con inclusiones de *A. platys*, y el analista que no haya tenido un buen entrenamiento en este tipo de diagnóstico, reportaría en este caso, un resultado falso positivo de anaplasmosis por *A. platys*. Los artefactos de tinción pueden también ser mal diagnosticados como inclusiones de *A. platys*. Sin embargo, esta técnica es de gran utilidad, si es realizada por una persona debidamente entrenada, ya que permite no solo hacer un seguimiento del curso de la infección experimental, como fue el caso del presente estudio, sino también analizar la morfología de otras células como los leucocitos, en búsqueda de alteraciones o de infecciones con *Ehrlichias spp.* y otros hemoparásitos intracelulares y extracelulares que los infectan.

### ***Microscopía electrónica***

Debido a que la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible, para poder realizar una identificación estructural de *A. platys* dentro de las células plaquetarias se requiere del microscopio electrónico de transmisión (MET), el cual utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto. Debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz visible, pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. Lo característico de este microscopio es el uso de una muestra ultrafina y que la imagen se obtenga de los electrones que atraviesan la muestra.

Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces. La microscopía electrónica (ME) ha sido aplicada al estudio de los organismos ehrlichiales, lográndose determinar que éstos son diferentes a los virus y protozoos (242, 304). La ME se utiliza hoy en día para caracterizar morfológica y estructuralmente a los organismos aislados, para así determinar si pertenecen o no al orden rickettsial (11, 120, 130, 271, 285).

### ***Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)***

Esta técnica serológica detecta a los anticuerpos producidos contra *A. platys* circulante en el suero del animal infectado, los cuales reconocen antígenos en las plaquetas infectadas fijadas a una lamina portaobjeto. Los complejos antígeno-anticuerpo son detectados por anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes bajo un microscopio de fluorescencia. La técnica ha sido creada por French y Harvey (96), siendo optimizada en Venezuela por Arraga *et al.* (10).

La prueba serológica puede dar resultados positivos en los individuos infectados, frente a la exposición del agente infeccioso, sin establecimiento de la infección, o, en individuos previamente infectados y curados, en donde la seropositividad puede mantenerse durante algunos meses.

La técnica de IFI tiene valor diagnóstico limitado si no se realiza conjuntamente con el examen clínico. Deben practicarse exámenes pareados que permitan determinar el título de anticuerpos en fase aguda y en fase convaleciente de la enfermedad o, al menos con 14 días de intervalo entre una y otra prueba. Un aumento o disminución del título de anticuerpos en un rango cuatro veces igual o mayor en la segunda muestra que en la primera, se interpreta como evidencia serológica de infección (231).

Debido a que los organismos del género *Anaplasma* poseen múltiples genes similares, que codifican proteínas principales de superficie con tamaños que van de 32 a 49 KDa, esta prueba de IFI puede dar reacciones cruzadas entre los miembros que conforman este mismo género (84).

### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e identificación molecular basada en el ADNr 16S.***

Diferentes autores han utilizado la técnica de PCR para amplificar el gen ARNr 16S del ADN de *A. platys* presente en la sangre de perros infectados (21, 54, 75, 85, 125, 138, 198, 201, 209, 281, 320). La PCR es una prueba de detección molecular basada en las propiedades bioquímicas del ADN, asociadas a la composición y secuencia de nucleótidos. Técnica altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas (6 pg) de ADN, posibilitando su fácil identificación (246). Emplea segmentos cortos y simples de nucleótidos llamados cebadores, cuyas secuencias son complementarias de las secuencias del ADN del organismo que se investiga (265).



En microbiología clínica la identificación molecular basada en el ADNr 16S (Gen ARNr 16S) se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. Fue reportada por primera vez en 1991 para determinar la diversidad filogenética de la familia *Rickettsiaceae*. Dentro de las innumerables aplicaciones de su utilización está la de poder identificar patógenos en forma directa, sin necesidad de cultivarlos (247). Precisamente *A. platys* no se ha podido cultivar hasta ahora, por lo que ha sido utilizada para detectar infecciones naturales y experimentales de esta bacteria en perros y confirmar infección, reinfección o estado portador (54, 198).

La amplificación de los cebadores permite la identificación del ADN bacteriano. Los cebadores y otros reactivos necesarios para que se produzca la reacción en cadena de la polimerasa se añaden a un volumen de solución que contiene ADN, representativo de la muestra de estudio, incluido ADN del hospedador y del microorganismo que se busca. La muestra puede ser cualquier tejido del hospedador que pueda portar al agente investigado (265). El ARNr 16S, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos (nt), codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica.

Cuando se pretende amplificar el ADNr 16S prácticamente completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, que originan amplicones de 1.500 pb, aproximadamente. Se ha demostrado, sin embargo, que una identificación precisa no siempre requiere la amplificación, y posterior secuenciación, del ADNr 16S completo. En estas circunstancias se utilizarán oligonucleótidos que permitan la amplificación de fragmentos de menor tamaño, preferentemente las 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen (216). De hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de un aislado clínico, necesitándose únicamente 2 iniciadores (228).

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada;

b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón y, c) análisis de la secuencia (246). La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante la PCR propiamente dicha. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, o mediante hibridación con sondas específicas. Todo este proceso suele durar aproximadamente 24 h (67).

La PCR consta de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADN. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión de los iniciadores, generalmente oscila entre 50 y 60 °C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde (246). Así se obtiene en poco tiempo millones de copias de la secuencia deseada del ADN (210, 211).

Dentro de los tipos de PCR está la PCR anidada, variante de la convencional, que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores en cada una, con el fin de mejorar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región de ADN mas extensa, que contiene el segmento diana. Después se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica (253). Existen variaciones de la técnica según los cebadores empleados, la concentración de los reactivos, la temperatura y/o la duración de cada ciclo. El protocolo a utilizar debe ser optimizado por cada laboratorio (158).

Sin embargo, la secuencia obtenida podrá contener errores y/o presentar posiciones ambiguas (indicadas por N). Por ello, la obtención de la secuencia definitiva

requiere la evaluación de los electroferogramas y la alineación de la cadena directa con la reversa, para resolver las posibles discrepancias. Así, aunque la secuenciación de una cadena del amplicón puede conducir a una correcta identificación, la calidad de la secuencia será óptima cuando la comparación de ambas cadenas se utiliza para la corrección de errores (246).

Finalmente el análisis de la secuencia será la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en bases de datos. Existen distintas bases de datos, algunas públicas, con acceso libre a través de internet: GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms).

Otras bases de datos son privadas, como MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System). RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) es la principal base de datos de secuencias de ADNr (no sólo 16S, sino también 23S de procariotas, y 18S y 28S de eucariotas). Permite la comparación de secuencias *on line*, y ofrece otras muchas posibilidades (incluida la construcción de árboles filogenéticos). La base de datos RIDOM (<http://www.ridom.de>) se limita también a secuencias de ADNr, centrándose solo en microorganismos patógenos. Finalmente, se puede construir un árbol filogenético, que refleje, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas (246).

### ***Evaluación de algunas variables de la hemostasia primaria***

#### ***Exploración Física***

Se debe prestar especial atención a la presencia de lesiones hemorrágicas. Entre éstas, petequias (pequeñas manchas hemorrágicas lenticulares, del tamaño de una cabeza de alfiler), equimosis (manchas subcutáneas violáceas, con extravasación sanguínea moderada) y hematomas (auténticas colecciones de sangre que infiltran el tejido subcutáneo o las masas musculares). Ante las hemorragias de un solo órgano (estómago, pulmones, riñones) cabe pensar en lesiones locales antes que en un trastorno de la hemostasia (218).

#### ***Determinación de IgG asociada a plaquetas (IgGAP)***

Este tipo de ensayo suministra evidencia cuantitativa para trombocitopenia

mediada inmunitariamente. Las plaquetas sanguíneas son dianas para moléculas de anticuerpos. Cuando los anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de la plaqueta aparecen en la sangre y se fijan a éstos sobre la plaqueta, a través de la región Fab<sub>2</sub> de la molécula del anticuerpo, las plaquetas recubiertas por estos anticuerpos son dañadas y secuestradas a una velocidad acelerada, manifestada por un acortamiento de su vida. Cuando la tasa de destrucción excede la velocidad de producción plaquetaria, aparece la trombocitopenia (119).

La IgG unida a plaquetas puede medirse en forma directa o indirecta. El anticuerpo antiplaquetario es principalmente una IgG (IgGAP) y su presencia en el suero de los animales infectados puede ser detectada por el método de citometría de flujo (119, 183). La técnica se basa en el uso de una anti-IgG conjugada con fluoresceína, ésta puede ser utilizada para detectar el anticuerpo unido a las plaquetas del animal enfermo (prueba directa) o el anticuerpo antiplaqueta libre en el suero, el cual se incubaba luego con plaquetas normales (prueba indirecta). Esta técnica permitirá analizar y separar las células que previamente han sido marcadas con un fluorocromo (119).

#### ***Recuento de plaquetas***

El recuento manual consiste en realizar un conteo de las plaquetas en una sangre venosa, diluida con oxalato de amonio, en una cámara de Neubauer (40). Los valores de referencia en perros se encuentran en la Tabla I.

#### ***Pruebas específicas de funcionalismo plaquetario***

##### ***Agregometría plaquetaria***

La agregación plaquetaria *in vitro* es un esfuerzo por caracterizar la capacidad *in vivo* de las plaquetas para formar el tapón hemostático primario. El conocimiento de la función plaquetaria se facilita con la utilización de los agregómetros fotométricos. Existen dos métodos de agregación plaquetaria, el método turbidimétrico, que utiliza como muestra un PRP y el método de impedancia eléctrica, que puede utilizarse en PRP y en sangre total. El uso del PRP, a pesar de su indiscutible valor en el estudio de la fisiología de las plaquetas, tiene como limitación principal el estudio de las plaquetas separadas del resto de los otros elementos sanguíneos. Estas limitaciones pueden evitarse realizando la agregación plaquetaria en sangre total (49).

El método turbidimétrico se basa en medir el cambio de la transmisión de luz

después de añadir un agonista a un PRP (33). El método por impedancia, se basa en medir el aumento de la resistencia al pasaje de corriente eléctrica a través de dos electrodos, cuando los agregados plaquetarios formados se depositan sobre ellos. Al igual que para el método turbidimétrico, se requiere la acción de agonistas como el colágeno, ADP, trombina, adrenalina, araquidonato, etc (49, 146).

Durante un breve tiempo de equilibrio se forma una monocapa de plaquetas sobre los alambres de los electrodos, resultando en un valor de impedancia estable. A esta línea base de impedancia se le asigna un valor de cero ohms de resistencia. Un agente agregante es añadido a la cubeta y las plaquetas estimuladas agregan a la monocapa de plaquetas antes formada sobre los alambres inmersos en la sangre. La acumulación de plaquetas produce resistencia eléctrica adicional al circuito. Estos cambios de resistencia son medidos en ohmios, la prueba dura de 6 a 10 minutos después de la adición del agonista (56). La evaluación de la función de las plaquetas por el método de impedancia en sangre completa tiene varias ventajas sobre el sistema óptico convencional:

1) La actividad agregante del total de la población de plaquetas en la sangre es monitoreada, mientras que en la centrifugación para la preparación del PRP, algunas plaquetas grandes y gigantes (pesadas) pueden sedimentar junto con las células rojas y blancas, de manera que la respuesta de agregación o secreción de solo una parte de la población plaquetaria sería estudiada, y es posible que plaquetas que se desean estudiar sean descartadas junto con los glóbulos rojos (49).

2) No requiere centrifugación antes del ensayo, por tanto evita el daño a las plaquetas, y se conserva mejor la función plaquetaria. 3) Se estudia el comportamiento de las plaquetas en su medio natural o fisiológico, lo que permite mimetizar mejor la función plaquetaria *in vivo*, en presencia de eritrocitos y leucocitos, los cuales se conoce que modulan la función plaquetaria. Se ha demostrado que los leucocitos activados liberan proteasas como la catepsina G, que promueve la adhesión y la agregación plaquetaria (167). Por tanto las plaquetas pueden comportarse diferente en presencia de eritrocitos y leucocitos que en el PRP (49, 241).

4) Es una técnica de mucho valor para muestras con contaje bajo de plaquetas, hematocrito alto o bajo, y plaquetas grandes, en estas condiciones la obtención de suficiente PRP para el estudio de la función plaquetaria por el método óptico se vuelve

difícil, si no imposible (5, 145). Tiene una sensibilidad mayor a pequeñas cantidades de agregados plaquetarios, y por esta razón, probablemente no es capaz de detectar pequeñas cantidades de inhibición de la respuesta de agregación (cambios sutiles), esto último sería una desventaja (145, 150).

Aunque el recuento plaquetario es considerado uno de los principales determinantes de la agregación plaquetaria *in vitro* (283), no es considerado un factor de variación de la agregación plaquetaria, siempre que se encuentre dentro del rango normal ( $200-500 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) (144, 146). Además, el hematocrito no influye sobre la respuesta de agregación inducida por colágeno (195).

Cattaneo *et al.* (53) y Linnemann *et al.* (188) han observado en humanos sanos, tratados o no con clopidogrel o aspirina, inhibición de la agregación plaquetaria después de ajustar el recuento de plaquetas en el plasma rico en plaquetas (PRP) con plasma pobre en plaquetas (PPP) en comparación con mediciones en PRP no ajustado. Los mismos consideran que esta practica de ajuste de PRP con PPP autólogo para corregir, debería ser evitada, porque afecta a la función plaquetaria, independientemente del cambio inducido en el recuento plaquetario. Además, es probable que estas manipulaciones compliquen la realización de la prueba sin necesariamente suministrar información de valor clínico (283).

Se han publicado estudios que evalúan la función plaquetaria sin ajustar el número de plaquetas previo al ensayo, con resultados de no variación en las curvas de respuesta con respecto al número de plaquetas, en donadores sanos, con un rango de plaquetas entre  $150-400 \times 10^9 /\text{L}$ , pero en donadores trombocitopénicos con menos de  $150 \times 10^9$  plaquetas/L, la agregación plaquetaria si llega a ser alterada (72).

La agregación plaquetaria en sangre total medida por impedancia eléctrica ha sido descrita en perros por diferentes investigadores (20, 91, 113, 150, 156, 159, 313). Los valores de referencia se encuentran en la Tabla I.

### ***Secreción de ATP por las plaquetas (lumiagregometría)***

Las sustancias empleadas como marcadores de la reacción de secreción de los cuerpos densos de las plaquetas son el ATP, la serotonina y el calcio. Una de las técnicas para valorar el ATP, por medio del complejo enzimático luciferin-luciferasa, utiliza el lumiagregómetro, pudiendo ser utilizado simultáneamente para medir la agregación

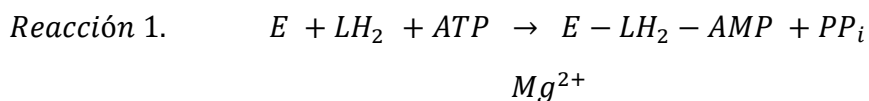
plaquetaria y la secreción de ATP desde los gránulos densos de las plaquetas (64). Meyers *et al.* (204), en un estudio de tipo comparativo, evaluaron el contenido de los gránulos densos de las plaquetas de diferentes especies animales, determinando que el contenido total de ATP en las plaquetas de perros era  $4,3 \pm 0,8 \mu\text{mol}$  por  $10^{11}$  plaquetas, la fracción de ATP no secretable  $3,0 \pm 0,5 \mu\text{mol}$  por  $10^{11}$  plaquetas y la fracción de ATP secretable  $1,3 \pm 0,4 \mu\text{mol}$  por  $10^{11}$  plaquetas, siendo el porcentaje de ATP = liberado  $30 \pm 5 \%$ . Los valores de secreción plaquetaria de ATP en perros se encuentran en la Tabla I.

El fundamento de esta técnica, que utiliza el complejo luciferina-luciferasa es el siguiente: un extracto de libélula buferado, el cual se ha añadido al PRP o sangre, llegará a ser luminiscente en presencia del ATP liberado de los gránulos densos plaquetarios. Un tubo fotomultiplicador sensible detecta la luminiscencia y provee una salida de voltaje, el cual es directamente proporcional a la cantidad de ATP liberado. El voltaje es registrado como la curva de secreción de ATP. Después de cada prueba, se debe inyectar una cantidad conocida de ATP dentro de la cubeta con la muestra para calibrar la gráfica de secreción en el papel (178).

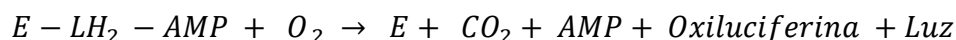
La detección quimioluminiscente de ATP por medio de la reacción de la luciferasa es el ensayo más sensible para medir en tiempo real el ATP liberado de las células, debido a la gran sensibilidad del tubo fotomultiplicador del lumiagregometro a la luz, lo que permite medir concentraciones muy pequeñas de ATP. Este ensayo permite medir el ATP no solo sensiblemente y cuantitativamente, sino también continuamente, en suspensiones de células y organelos metabólicamente activos (178).

El ensayo está basado en el requerimiento absoluto de ATP por la luciferasa para producir luz. En presencia de iones magnesio la luciferasa cataliza la reacción de luciferina, ATP y  $\text{O}_2$  para formar oxiluciferina, AMP,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{PP}_i$  y luz de aproximadamente 560 nm. El ensayo de bioluminiscencia es extremadamente sensible, la mayoría de los luminómetros pueden detectar tan poco como 1 picomol de ATP preexistente o ATP generado en el sistema cinético (178).

El ensayo de luminiscencia se basa en dos reacciones catalizadas por la luciferasa:



### *Reacción 2.*



E= enzima luciferasa      LH<sub>2</sub>= luciferina

El paso de activación inicial (reacción 1) es la formación de la enzima luciferasa unida a luciferil-adenilato (E-LH<sub>2</sub>-AMP) y PPi. Esta reacción 1 es reversible y requiere un catión divalente tal como el Mg<sup>2+</sup>. El complejo enzima luciferil adenilato entonces reacciona irreversiblemente con oxígeno molecular (reacción 2) para producir un quantum de luz, AMP, CO<sub>2</sub>, y oxiluciferina (178, 194).

Este producto de inhibición es el principal factor a ser disputado cuando se emplea luminiscencia de luciferasa de luciérnaga como una medición continua de la concentración de ATP (178). La medición de la luminiscencia de la secreción de ATP provee una evidencia inequívoca de normalidad o alteración de la liberación de los gránulos densos.

Esto incrementa la sensibilidad de la prueba a defectos de secreción y deficiencia del pool de almacenamiento (178). Por otra parte, la liberación máxima de ATP con trombina varía muy poco a pesar de un amplio rango de recuento plaquetario en sangre completa (250-450 x 10<sup>3</sup>/μL) y de hematocrito (37- 46%), ésto es probablemente debido a la natural heterogeneidad plaquetaria (144, 146).

### ***Determinación cuantitativa de la concentración de FvW:Ag***

Varios ensayos son realizados para investigar la concentración o función del FvW. Los ensayos mas frecuentes pertenecen a las siguientes categorías: a) determinación de la concentración de FvWAg por técnicas como electroforesis de rocket, ELISA e inmunoturbidimetría y b) determinación de la actividad por técnicas de aglutinación, agregación plaquetaria en PRP y ensayos de unión al colágeno por ELISA (206). Rangos normales de FvW en perros están entre 70 a 180% y en el límite de lo normal entre 50 a 69% (Tabla I).

### ***Evaluación de algunas variables de la hemostasia secundaria***

#### ***Tiempo de protrombina (TP)***

Esta prueba evalúa la eficiencia de la vía extrínseca y de la vía común de la coagulación, midiendo la formación del coágulo plasmático, en presencia de un exceso de extractos tisulares (FT). El TP es más sensible a las deficiencias de los factores VII,



X y V o a la presencia de un inhibidor contra los mismos, que a la deficiencia de protrombina (Factor II). La tromboplastina utilizada, en función de su sensibilidad, influye mucho en los resultados del TP, siendo necesario que cada laboratorio determine sus valores normales con sus técnicas, reactivos y aparatos (6). La vía extrínseca de la coagulación es más activa en perros que en el hombre ya que tienen una mayor concentración de los factores VII, X y V (184, 322). Por este motivo los valores de referencia de TP en perros son mas cortos encontrándose entre 5 a 9 s (Tabla I).

#### ***Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)***

Se fundamenta en la medición del tiempo de coagulación del plasma, en presencia de una “tromboplastina parcial” (cefalina), la cual sustituye a la acción de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria. Sirve para explorar toda la vía intrínseca y la vía final común, siendo particularmente sensible a los defectos de los factores de la vía intrínseca. El reactivo usado en la determinación del TTPa debe ser suficientemente sensible para detectar niveles reducidos de factores que se asocian con sintomatología hemorrágica, aunque un problema potencial del uso de reactivos sensibles es que pueden detectar anomalías clínicamente irrelevantes del tipo de déficits de precalicreina y cininógeno de alto peso molecular o FXII (6).

Una vez confirmado que el TP, el TTPa o ambos están prolongados, hay que determinar si la causa es un déficit de factores de la coagulación o la presencia de un inhibidor, para lo cual se debe realizar un estudio de mezclas de plasma del paciente y plasma normal (6). También la vía intrínseca es más activa en los perros en comparación con el humano, debido a la mayor concentración de los factores de la coagulación, en especial FVIII, FIX, FX y FV, por lo que son mas cortos los valores de referencia del TTPa (184, 322) encontrándose entre 10,8 y 13,5 s (Tabla I).

#### ***Determinación de la concentración de fibrinógeno***

En las pruebas de coagulación, la determinación del fibrinógeno es uno de los parámetros de rutina. Existen diferentes métodos que permiten estudiar a la molécula de fibrinógeno, métodos de coagulación, inmunológicos, etc. El método gravimétrico se basa en la conversión del fibrinógeno en fibrina mediante la recalcificación de un plasma (147). El rango normal esperado en perros es de 200-400 mg/dL (Tabla I). Los resultados son altamente dependientes de la edad. El fibrinógeno muestra una

pronunciada respuesta en fase aguda. Concentraciones < 50 mg/dL pueden asociarse con sangramientos. Un consumo elevado de fibrinógeno es típico en CID (167).

#### ***Determinación del factor XIII por el método de disolución en urea***

La estabilización de la fibrina es necesaria para una hemostasia efectiva. Las pruebas de coagulación de despistaje (TP, TTP, TT) rinden resultados normales en presencia de una deficiencia de FXIII. La estabilización de la fibrina es necesaria para una hemostasia efectiva. El polímero de fibrina es estabilizado por la acción del factor XIII activado (FXIIIa) en presencia de ión calcio, debido a la formación de uniones covalentes de las cadenas de los monómeros de fibrina.

En ausencia del FXIIIa, la fibrina se mantiene solo por medio de enlaces electrostáticos. La presencia de FXIII se evaluó por medio de un ensayo funcional, que evidenciaba la solubilidad incrementada o no de un coágulo en urea 5 M. La prueba se considera normal cuando el coágulo no se solubiliza en 24 horas (27).

#### ***Pruebas para diagnosticar desórdenes del sistema fibrinolítico***

##### ***Tiempo de lisis del coágulo de euglobulina***

Se basa en precipitar en medio ácido las euglobulinas del plasma, en donde se encuentran el fibrinógeno, plasminógeno y activadores del plasminógeno, quedando en solución la mayor parte de los inhibidores. El precipitado de euglobulinas es disuelto, en medio alcalino y luego es coagulado.

El tiempo de lisis de este coágulo es inversamente proporcional a la actividad fibrinolítica plasmática (174). También la fibrinólisis está aumentada en perros, como lo demuestran los valores mas cortos del tiempo de lisis de euglobulina; si este coágulo está aún presente y firme después de 90 minutos, la fibrinólisis es normal (46). La desaparición del coágulo antes de los 90 minutos indica fibrinólisis aumentada en perros o hipofibrinogenemia. Tiempo de lisis mayor de 18 horas ocurre en cuadros de hipofibrinólisis.

#### ***Marcadores fibrinolíticos: determinación de Dímeros D-D***

##### ***Método de aglutinación de partículas de látex***

La degradación patológica de la fibrina y fibrinógeno resultará en aumento de los productos de fibrina o fibrinógeno (PDF). Los productos de fragmento-D permanecen covalentemente unidos a fragmentos-D similares de moléculas vecinas de

fibrina. Estos fragmentos-D unidos son liberados como dímeros-D solubles (167). Para medir derivados de fibrina se utiliza el ensayo de dímero D-D, por su baja reactividad para entrecruzarse con el fibrinógeno, hace que pueda ser aplicado en ensayos en plasma.

Niveles de D-D son elevados en todos los pacientes con CID, haciendo del ensayo un marcador sensible para esta patología. Sin embargo, este ensayo no es tan específico, debido a que cualquier desorden que resulte en formación y ruptura de la fibrina entrecruzada puede potencialmente elevar al dímero-D, por lo que no es específico para CID, porque resultados positivos pueden presentarse en muchas otras patologías (197).

La prueba de aglutinación de partículas de látex es rápida y semicuantitativa y determina productos de degradación de fibrina Dímeros-D solubles. Utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón anti D-D humanos. La prueba es positiva con concentración de D-D que superen 450 ng/mL en el plasma del perro (Tabla I). Los perros tienen una menor concentración de PDF circulantes en comparación con el humano (46).

Valores aumentados sugieren la existencia de una fibrinólisis secundaria, es decir formación de fibrina intravascular y posterior proteólisis de la fibrina entrecruzada por la plasmina (fibrinólisis). Porque el dímero-D no es liberado en fibrinogénolisis primaria (ruptura de fibrinógeno), la prueba de dímero-D es específica para ruptura de fibrina, tal como ocurre en coagulación intravascular diseminada, terapia trombolítica y trombosis de venas profundas (167).

# METODOLOGÍA

## CAPÍTULO I

### **Obtención del inóculo de *Anaplasma platys* Maracay a partir de perros infectados con esta rickettsia**

#### ***Obtención del primer aislado de plaquetas con *A. platys****

Se extrajo sangre venosa con la sal potásica del ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA-K<sub>3</sub>) a una perra de raza pastor alemán, de 3 meses de edad y siete kilos de peso, paciente del Hospital Veterinario de Pequeños Animales “Dr. Daniel Cabello”, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Central de Venezuela, en Maracay (Estado Aragua). Esta cachorra procedía de San Joaquín (Estado Carabobo), y presentaba signos de decaimiento, inapetencia, emaciación, diarrea y vómito, siendo su temperatura corporal de 38,7°C. Tres de sus hermanos de la misma camada acababan de morir, habiendo presentando sintomatología similar. Los análisis comprobaron que estaba infectada de forma natural con *A. platys*.

El diagnóstico de la bacteria se realizó mediante la técnica descrita por Arraga (13), tiñendo un frotis de capa blanca (pequeña porción enriquecida con plaquetas y leucocitos, que separa el plasma de la capa roja de eritrocitos en un hematocrito) con Hemacolor (Merck). Se examinaron con el objetivo de 100 x los glóbulos blancos y las plaquetas, diagnosticándose como positivo para *A. platys*, ya que en la muestra se observaron inclusiones teñidas de color morado en el interior de las plaquetas.

No se observaron inclusiones en los leucocitos de la muestra, por lo que no fue positivo a *E. canis* por esta técnica. Se midió el porcentaje de plaquetas infectadas con *A. platys* en un frotis de sangre teñido, examinando 200 plaquetas, alcanzando éste un 15%. Para la preparación del aislado de *A. platys* se recolectó sangre con EDTA-K<sub>3</sub> y se centrifugó a 160g x10 minutos (min) a 24°C para obtener un plasma rico en plaquetas

(PRP), conteniendo  $620 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ . Se diluyó el PRP volumen a volumen con glicerol al 10% como crioprotector en solución buffer fosfato (PBS) pH 7,2, alicuotándose en volúmenes de 1 mL y conservándose en nitrógeno líquido hasta su uso. La preparación del aislado se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Parasitología en conjunto con el Laboratorio de Hematología y Coagulación Sanguínea de la FCV, UCV.

#### ***Amplificación del volumen del aislado de A. platys***

Con la finalidad de producir una cantidad de inóculo suficiente para infectar a los seis perros del ensayo final (capítulo II), se procedió a inducir la infección experimental en tres perros mestizos sanos de 7 meses de edad. Se sometió a los animales a estrés calórico, disminuyendo la calidad del alimento durante 2 semanas, y se inmunosuprimió a los animales con Prednisona (2 mg/kg de peso). Posteriormente se procedió a inyectar a los perros, por vía intravenosa, dos alícuotas del PRP infectado con *A. platys* (aislado obtenido de la cachorra pastor alemán), previamente diluido con solución salina fisiológica (SSF).

Se llevó un registro diario en cada perro de las siguientes variables: temperatura rectal, concentración de hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas y leucocitos y porcentaje de bacteriemia de *A. platys*, diagnosticada mediante FCB. No fueron observadas inclusiones en los leucocitos. Uno de los tres perros obtuvo un elevado pico de infección (99%) a los 12 días, procediendo en este momento a extraer 100 mL de sangre, utilizando como anticoagulante EDTA K<sub>3</sub> (en una concentración de 1,7 mg/mL). Los otros dos perros alcanzaron bacteriemias menores (30 y 1%).

Se obtuvieron 30 mL de PRP, conteniendo  $143 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , con 90% de plaquetas con inclusiones. Este PRP fue mezclado volumen a volumen con glicerol al 10% en PBS pH 7,2, conservándose en alícuotas de 1 mL en nitrógeno líquido. Dicha mezcla constituyó el aislado de *A. platys*, que fue inoculado en los 6 Beagles utilizados en la Etapa II del trabajo, con el fin de obtener una infección aguda de *A. platys*, y estudiar su efecto en la hemostasia y fibrinólisis de estos perros.

#### ***Diagnóstico de A. platys en el aislado amplificado de plaquetas***

##### ***Diagnóstico por microscopía electrónica de transmisión (MET)***

Se extrajo sangre con EDTA de un perro infectado experimentalmente con el

aislado amplificado de *A. platys* (10 % de bacteriemia), sometiéndose a centrifugación a 150 x g durante 8 minutos (min), a temperatura ambiente (TA). Se recolectó el PRP y se repartió en dos tubos de ensayo de 2 mL. Se procedió a la fijación de las estructuras plaquetarias en dos pasos: primero se añadió solución de glutaraldehído al 0,5% en PBS pH 7,2 a cada tubo, a una concentración final de 0,05% (11). La suspensión de plaquetas fue incubada a 37 °C durante 10 min y luego centrifugada a 1.500 x g durante 10 min, a TA. El sobrenadante fue descartado y al sedimento le fue añadido lentamente glutaraldehído al 3%, de manera que formara una capa sobre éste, incubándose durante 72 horas (h) a 4°C (11).

La continuación del proceso de preparación de la muestra se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Este procedimiento consistió primero en un lavado con buffer cacodilato 0,1M pH 7,4 dos veces durante 1 minuto. Se fijó con tetraóxido de osmio al 2% durante 2 horas, seguido por dos lavados con agua durante diez minutos cada vez. Deshidratándolo con alcohol al 70, 90 y 100% y finalmente se procedió a la inclusión en resina mas óxido de propileno. Se observó en un microscopio marca Philips CM-10.

#### ***Diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar***

Se recolectaron 10 mL de sangre con EDTA-K<sub>3</sub>, de la vena yugular del perro mestizo con alta infección (99%). Se centrifugó a 160 g x 10 min, a 24°C para obtener el PRP, conservándolo a 4°C hasta su análisis y durante el transporte hasta el Laboratorio del Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT) de la Universidad Simón Rodríguez, donde fue realizado el diagnóstico. Se llevó a cabo la extracción del ADN a partir de 600 µL de PRP, utilizando un kit para la purificación de ADN genómico (Wizard<sup>®</sup> Promega, Madison, WI, EUA).

El procedimiento de aislamiento se realizó siguiendo las instrucciones del manual técnico de este producto. El ADN aislado se conservó a 4°C hasta su uso (el mismo día). El ADN del agente patógeno aislado del PRP del animal infectado fue utilizado como molde para amplificar un fragmento del gen ADNr 16S de *A. platys* mediante un PCR estándar, usando un par de cebadores que amplifican a un fragmento de aproximadamente 678 pares de base (pb) de este gen, que codifica al ARNr 16S. Se

ensayaron tres volúmenes diferentes (1, 5 y 8  $\mu\text{L}$ ) del ADN aislado en el paso anterior. La amplificación fue realizada en un volumen de reacción de 25  $\mu\text{L}$ , conteniendo 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) en una concentración de 800  $\mu\text{M}$  cada uno (Promega) y 1,25 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega).

Se utilizaron un par de cebadores, uno específico del género: EHR16SR (5'TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3') (225), para amplificar la región correspondiente de todas las *Ehrlichia sp.* y *Anaplasma sp.* y otro específico de *A. platys*: PLATYS (5'-GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG-3'), en una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$  (148).

El control negativo consistió agua destilada. La amplificación fue realizada en un termociclador Master cycler-ep gradients, (Eppendorf), con una primera desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguida de 45 ciclos de 5 min a 95 °C (desnaturalización), 30 s a 55 °C (hibridación), 9 s a 72 °C (extensión), más un ciclo adicional de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de la PCR fueron examinados mediante electroforesis en un gel de agarosa de 0,8%, teñido.

## CAPÍTULO II

### **Efecto de la inoculación de *A. platys Maracay* sobre la hemostasia en seis Beagles de un año de edad**

En el presente trabajo cada perro fue su propio control, lo cual hizo indispensable la evaluación de todas las variables en los animales antes de la inoculación del aislado. Por este motivo, la segunda etapa del trabajo constó, a su vez, de dos fases, una primera fase de 2 semanas, previa a la inoculación del aislado de *A. platys* (fase de preinoculación) y una segunda fase de 30 días, posterior a la inoculación del mismo (fase de postinoculación). En ambas fases se estudiaron todas las variables mencionadas en los objetivos específicos para la evaluación de la hematología, hemostasia, fibrinólisis y presencia de anticuerpos antiplaquetas. Además los animales fueron examinados para el diagnóstico de infección con *A. platys* y con *E. canis*.

#### ***Unidad Experimental***

#### ***Criterios de selección de los Beagles utilizados en el ensayo de infección experimental***

Se adquirieron seis cachorros de 4 semanas de edad, directamente de un criador, siguiendo los siguientes criterios de selección:

1. De la misma raza (Beagle) para evitar las variaciones genéticas. Para que hubiera mayor homogeneidad genética, cuatro de los machos eran hermanos por ambos padres y el macho restante y la hembra, por su parte, eran también, hermanos por ambos progenitores.
2. De la misma edad, y del mismo sexo la mayoría (5 machos y 1 sola hembra), para evitar variaciones fisiológicas.
3. Exploración física normal, libres de signos clínicos (fiebre, inapetencia, letargo, edema, signos respiratorios, mialgias, uveítis, vómito, palidez de mucosas, petequias, equimosis, epistaxis).
4. Estudios hematológicos normales (hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas y de leucocitos y fórmula diferencial de leucocitos).
5. Diagnóstico negativo de *E. canis* y de *A. platys* mediante FCB y la prueba de IFI.



### ***Ubicación y manejo de los animales***

Los animales se alojaron en jaulas individuales especiales, para que estuvieran libres de garrapatas, en un galpón ventilado, ubicado en el Centro de Bioquímica y Biofísica (CBB) del IVIC, en Altos de Pipe (Estado Miranda). La ración diaria de alimento seco comercial, adecuada a su peso y edad, fue repartida en dos porciones, suministradas en la mañana y al final de la tarde, suministrándoles agua *ad libitum*. Se desparasitaron tres semanas antes de la toma de muestras de sangre. Los animales fueron manipulados siguiendo todos los lineamientos éticos para el estudio con animales de experimentación.

### ***Diseño Experimental***

Cada animal constituyó una unidad experimental. Como se mencionó anteriormente, para la evaluación del efecto del aislado de *A. platys* sobre la hemostasia y la fibrinólisis, cada perro fue su propio control (pre y post-inoculación).

El experimento consistió en evaluar durante las dos semanas previas a la inoculación del aislado de *A. platys* algunas de las variables de la hemostasia y de la fibrinólisis, a saber, número de plaquetas, agregación y secreción plaquetarias, FvWAg, TP, TTPa, concentración de fibrinógeno, factor XIII, determinación del dímero-D, tiempo de lisis de euglobulina, hematocrito, hemoglobina, CHCM, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria.

También se tomaron muestras de sangre con la finalidad de realizar el diagnóstico de *A. platys* y de *E. canis* por análisis morfológico mediante microscopía de luz (FCB), por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por PCR y, además, para la medición de anticuerpos antiplaquetas (IgGAP).

Pasadas las dos semanas de preinoculación, se procedió a inocular a los caninos el aislado de *A. platys* obtenido en la Etapa I del trabajo. Para inducir la infección experimental se inyectaron a todos los animales en la vena yugular 6 mL del inóculo, descongelado previamente a TA. Este día constituyó el día cero del ensayo. Todos los días se les extraían 2 mL de sangre para realizar un seguimiento de la infección por medio del FCB, medición del número de plaquetas y del hematocrito; adicionalmente les fue medida la temperatura corporal. Una vez por semana y en el pico de la bacteriemia, les fueron extraídos 20 mL de sangre a todos los perros, con el fin de

evaluar todas las variables y de diagnosticar *A. platys* por IFI y por PCR.

### ***Recolección de la sangre***

Se extrajo la sangre mediante punción limpia de la vena yugular, con jeringa de plástico desechable y aguja calibre 21 x 1. La sangre fue repartida en tres tubos de ensayo. Un tubo de plástico, con citrato trisódico (3,8%) en proporción 9:1, para los estudios de hemostasia. Otro tubo de plástico con EDTA-K<sub>3</sub> (1,7 mg/mL) para la evaluación de la hematología, FCB, frotis de sangre completa y para la obtención de ADN de *A. platys*. Un tubo de vidrio sin anticoagulante para la obtención del suero, para la detección de IgGAP y para la prueba de IFI.

### ***Manejo de la muestra***

El PRP destinado a la prueba de PCR de *A. platys* y la capa blanca que se utilizó para la PCR de *E. canis* se congelaron a -80°C hasta su uso. Para la determinación del TTPa, TP, concentración de fibrinógeno, FvW y Factor XIII, se centrifugó la sangre citratada a 2.500 x g por 20 min a 5°C, para la obtención del plasma pobre en plaquetas (PPP). El PPP necesario para medir el FvW se congeló a -70 °C hasta su análisis. Para los estudios hematológicos y de agregación plaquetaria se utilizó la sangre (con EDTA y citratada, respectivamente) directamente. El suero destinado para el análisis de IgGAP y para el diagnóstico por IFI se congeló inmediatamente a -20°C hasta su análisis. Las variables estudiadas se analizaron en un lapso de tiempo no mayor de 3 horas después de extraída la muestra, excepto la medición de IgGAP, FvW, IFI y PCR.

## **FASE DE PREINOCULACIÓN**

### ***Pruebas de diagnóstico de A. platys y E. canis en los Beagles***

#### ***Diagnóstico morfológico por microscopía de luz***

Para la detección de *A. platys* y de *E. canis* se realizaron a las muestras obtenidas de los seis Beagles observaciones directas con el microscopio de luz de los FCB teñidos con Hemacolor. La posible presencia de inclusiones intraplaquetarias orientaría hacia una infección por *A. platys* y la de inclusiones intramonocíticas o intralinfocíticas sugeriría infección con *E. canis* (13).

#### ***Diagnóstico serológico por medio de IFI***

Para el diagnóstico de *A. platys* se utilizó el método reportado por French y

Harvey (96), utilizando como sustrato antigénico plaquetas infectadas con *A. platys*. Como anticuerpo anti-IgG canino se utilizó el producido en conejo y conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson Immunoresearch Laboratories, EUA), observando en un microscopio de fluorescencia a una magnificación de 1000 X.

Se considera signo de positividad a *A. platys* las inclusiones con fluorescencia verde manzana brillante, a nivel del citoplasma de la plaqueta. Se corrieron simultáneamente con la muestra controles negativos y positivos. Se asumió como positivo un título de anticuerpos mayor a 1:160. Este ensayo se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia.

En este mismo laboratorio se realizó el diagnóstico para *E. canis*, según la técnica de Rikihisa *et al.* (243), utilizando suspensiones de células infectadas DH82, colocadas en láminas a una concentración de  $10^3$  células por pozo. Las células fueron secadas y fijadas con acetona fría y posteriormente se incubaron con diluciones seriadas de los sueros de los animales, a 37°C por una hora. Después de tres lavados con PBS las células fueron incubadas con anticuerpo anti-IgG canino, producido en conejo y conjugado con FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, EUA).

Se observaron posteriormente las muestras en un microscopio de fluorescencia a una magnificación de 1000 x. En caso positivo a *E. canis* deben evidenciarse las inclusiones con fluorescencia verde manzana brillante, a nivel del citoplasma de los monocitos. Se corrieron simultáneamente con las muestras problema controles negativos y positivos. Se consideró como positivo un título de anticuerpos mayor a 1:160.

#### ***Optimización de la técnica de PCR anidada***

Se realizaron dos ensayos previos a la ejecución de la técnica de PCR anidada con la finalidad de optimizar la temperatura de hibridación y determinar la sensibilidad de la técnica con el par de cebadores internos PLATYS y EHR16SR.

#### ***Optimización de la temperatura de hibridación***

Se realizó una PCR para amplificar un fragmento del ADNr 16S de *A. platys*, según lo descrito por Martín *et al.* (198). Se utilizaron para la primera ronda de PCR el par de cebadores: 8F (5'-AGT TTG ATC ATG GCT CAG-3') y 1448R (5'-CCA TGG CGT GAC GGG CAG TGT G-3'), el cual amplifica la mayoría del gen ARNr 16S de la familia *Anaplasmataceae* (307) y para la segunda ronda, se utilizó el par

PLATYS (5'-GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG-3') (148) y EHR16SR (5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3') específico *A. platys* (225).

Se optimizó la temperatura de hibridación de los cebadores ensayando un gradiente de temperaturas (40, 44, 46, 51, 54, 56, 58 y 60°C). En base a este análisis se seleccionó la temperatura óptima de hibridación para la PCR-anidada utilizada en el diagnóstico molecular de *A. platys* de las muestras de los perros del ensayo.

#### ***Determinación de la sensibilidad de la PCR anidada con el par de cebadores PLATYS y EHR16SR***

La sensibilidad de la PCR anidada con el par de cebadores PLATYS y EHR16SR fue medida ensayando siete diluciones seriadas de ADN de *A. platys* (50; 25; 12,5; 6,25; 3,25; 1,56 y 0,78 ng).

#### ***Análisis de algunas variables de la hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis en los Beagles antes de la inoculación con A. platys Maracay***

La metodología de estas variables se explica, en la fase de postinoculación.

### **FASE DE POSTINOCULACIÓN**

En la fase de postinoculación también se realizó el diagnóstico de *A. platys* y de *E. canis* por medio del FCB y de IFI, siguiendo la metodología explicada previamente en la fase de preinoculación. Además de estas dos pruebas, también les fue realizado a los Beagles el diagnóstico de las dos bacterias mediante la técnica de PCR.

#### ***Diagnóstico molecular de A. platys a partir del ADN aislado de las muestras de PRP mediante la prueba de la PCR anidada***

Este ensayo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología de Parásitos del Centro de Bioquímica y Biofísica (CBB) del IVIC. Se centrifugaron 5 mL de sangre a 150 g x 5 min, y se separó el PRP, a partir del cual se aisló ADN de la bacteria, utilizando un kit de BDtract™ (Maxim Biotech, Inc. San Fco. EUA) para purificar ADN genómico, siguiendo las instrucciones del fabricante. La determinación de la concentración del ADN aislado fue estimada utilizando un espectrofotómetro (Gene Quant Prop, Amershan Bioscience). Se tomaron 7 µL de ADN, diluyéndose con 63 µL de agua destilada estéril y se midió su densidad óptica (DO) a 260 nm, y también a 280 nm, para verificar la pureza del mismo, siendo ésta aceptable en todas las muestras.

La amplificación de ADNr 16S para *A. platys* se realizó mediante una PCR anidada, según lo descrito por Martin *et al.* (198), con algunas modificaciones. La primera amplificación fue realizada en un volumen de 25  $\mu$ L conteniendo 3mM de MgCl<sub>2</sub>, desoxirribonucleótidos trifosfato en una concentración de 0,2 mM cada uno (Promega, Madison, WI, EUA), 1,25 U de GoTaq flexi DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, EUA), ADN de un perro infectado con *A. platys*, en una concentración final de 2 ng/ $\mu$ L, y 0,25  $\mu$ M de los cebadores 8F y 1448R. En la Tabla II pueden observarse algunas de las características de los cebadores utilizados en el presente estudio.

El protocolo para la amplificación del ADNr 16S de *A. platys* fue similar al descrito por Martin *et al.* (198), con cambios en la temperatura de hibridación. Se utilizó la temperatura de 60°C, la cual fue obtenida en el ensayo de optimización anteriormente descrito, y se utilizó el par de cebadores, PLATYS y EHR16SR específicos para amplificar el segmento interno del producto de la PCR de la primera ronda (148). Se ensayó agua en lugar de muestra como control negativo, y ADN de *A. platys* aislado de un perro infectado naturalmente con *A. platys* como control positivo.

#### ***Diagnóstico molecular de E. canis mediante la técnica de la PCR anidada***

Se practicó en el mismo Laboratorio de Fisiología de Parásitos del CBB, IVIC, según como lo describió Gutiérrez *et al.* (121). La primera amplificación fue realizada en un volumen de 50  $\mu$ L, conteniendo 5mM de MgCl<sub>2</sub>, desoxirribonucleótidos trifosfato en una concentración de 0,2 mM cada uno (Promega, Madison, WI, EUA), 1,25 U de GoTaq flexi DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, EUA). ADN de cada uno de los seis perros, en una concentración final de 10 ng/ $\mu$ L, y 0,25  $\mu$ M de los cebadores ECB (5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A -3') y ECC (5'-AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C -3') (73,74). Estos cebadores fueron utilizados para amplificar la región correspondiente del gen del ARNr 16S de la familia *Anaplasmataceae* (Tabla II).

Para la segunda ronda de amplificación el protocolo fue similar, utilizándose un par de cebadores, HE-3 (5'-TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT-3') CANIS (5'-CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG AA-3') (8), género específico de *Ehrlichia canis*, para amplificar el segmento interno del producto de la PCR inicial (310). Se ensayó agua destilada estéril como control negativo. Se usaron 2

**Tabla II. Cebadores utilizados en este trabajo en el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar al gen ARNr 16S de los organismos *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys***

nombre	cebador secuencia del primer (5'-3')	producto		programa			organismo detectado	referencia
		tamaño	concentración final	ciclos	°C	m		
<b>ECB</b> (1°)	CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A	483 pb	2 pmol	1	94	4	<i>Ehrlichia/</i> <i>Anaplasma</i>	Dawson <i>et al.</i> (73)
<b>ECC</b> (1°)	AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C	”	”	1	72	1		
<b>ECA</b> (2°)	CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG AA	388 pb	2 pmol	1	94	4	<i>E. canis</i>	Wen <i>et al.</i> (310)
<b>HE-3</b> (2°)	TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT	”	”	1	72	1		
<b>8F</b> (1°)	AGT TTG ATC ATG GCT CAG	1448pb	0,25 µM	40	94	1	<i>Ehrlichia/</i> <i>Anaplasma</i>	Warner y Dawson (307)
<b>1448R</b> (1°)	CCA TGG CGT GAC GGG CAG TGT G	”	”	1	72	1 40		
<b>PLATYS</b> (2°)	GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG	678 pb	0,25 µM	1	94	1	<i>Anaplasma platys</i>	Inokuma <i>et al.</i> (148)
<b>EHR16SR</b> (2°)	TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC	”	”	1	72	- 30		
				1	94	- 30		
				1	72	5		Parola <i>et al.</i> (225)

m = minutos; s= segundos; 1° = primera ronda; 2° = segunda ronda

controles positivos, un ADN de *E. canis* extraído a partir de la sangre de un perro infectado naturalmente, y un ADN obtenido a partir de un cultivo de células DH82 infectadas con *E. canis* (donado amablemente por la Profesora Clara Nancy Gutiérrez, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua).

***Secuenciación del ADNr 16S de A. platys aislado de los productos de PCR del PRP de uno de los Beagles infectados con A. platys***

La muestra del ADN purificado fue enviada al servicio comercial de secuenciación automática de ADN MacroGen Inc. (Corea), el cual determinó la secuencia de nucleótidos de aproximadamente 678 pb, obtenida de la amplificación por PCR, de ambas cadenas delantera y reversa del ADNr 16S. En un primer paso del proceso se corrió por electroforesis un gel de agarosa al 2% con el producto de la PCR de la segunda ronda y, la banda obtenida con el fragmento de ADN amplificado fue cortada y purificado el ADN con un kit diseñado para este fin (Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System Promega, Madison, WI, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron los mismos cebadores de la PCR anidada, PLATYS y EHR16SR. Este análisis permitió la identificación del ADN amplificado a partir de la sangre de uno de los perros infectados experimentalmente con *A. platys*. Otra muestra del ADN se envió al Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del IVIC para realizarle el mismo análisis de secuenciación.

***Comparación de la secuencia del ADNr 16S de A. platys obtenido en el presente trabajo con las secuencias publicadas en las bases de datos***

Alineamientos múltiples de la secuencia de ADNr 16S de *A. platys* obtenida en este trabajo y las secuencias depositadas en la base de datos GenBank NCBI (National Center For Biotechnology Information) fueron realizados utilizando el programa BLAST (7) para identificar secuencias de diferentes especies de *Anaplasma spp.*, previamente reportadas, homólogas a la obtenida en el presente estudio. Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular de Eucariotas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua.

***Análisis filogenético del aislado de A. platys obtenido en Maracay (Aragua)***

Las secuencias de ADNr 16S de *Ehrlichia* y *Anaplasma* en la base de datos GenBank y

la secuencia obtenida en el presente estudio fueron utilizadas para generar un árbol filogenético empleando el análisis Neighbor-Joining (NJ), mediante el programa MEGA (172). Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio Regional de Diagnóstico del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua.

La metodología utilizada para el análisis de algunas variables hematológicas, hemostáticas y fibrinolíticas y para los IgGAP de los Beagles, realizadas antes y después de la inoculación, se explica a continuación:

### ***Estudio de algunas variables de la hematología***

#### ***Recuento de leucocitos***

Se obtuvo diluyendo la sangre 1:20 con ácido acético al 3%, mezclando y contando los leucocitos en la cámara de Neubauer (258).

#### ***Recuento diferencial de leucocitos***

Se realizó mediante extendidos de sangre periférica en láminas portaobjetos, fijándolos con metanol y coloreándolos con Hemacolor. Las láminas se observaron al microscopio con objetivo de inmersión, contando los distintos tipos de leucocitos, hasta enumerar un total de 200 glóbulos blancos en áreas de monocapa celular, en diferentes campos del frotis. El número de leucocitos se reportó en valor absoluto (258).

#### ***Concentración de hemoglobina***

Fue determinada colorimétricamente mediante la técnica de Wong (315), por el método de la cianometahemoglobina, utilizando un patrón de hemoglobina (Wiener Lab. Rosario. Argentina) y una solución de Drabkins (Wiener Lab. Rosario. Argentina). Se leyeron a 540 nm la densidad óptica (DO) del patrón y de las muestras problema, en el espectrofotómetro DU Beckmann. Se calculó el factor de calibración (Fc) dividiendo la concentración del patrón de hemoglobina (g/dL) entre la DO del patrón de hemoglobina. La concentración de hemoglobina (g/dL) de las muestras se calculó multiplicando el Fc por la DO de la muestra problema.

#### ***Concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM)***

Índice hematimétrico que mide el peso de la hemoglobina en relación con el volumen del eritrocito y se expresa en g/dL (258), según los valores obtenidos después de utilizar la siguiente fórmula:



$$CHCM \left( \frac{g}{dL} \right) = \frac{\text{concentración de hemoglobina} \left( \frac{g}{dL} \right)}{\text{hematocrito} (\%)} \times 100$$

***Volumen del paquete de eritrocitos (PCV) o valor del hematocrito***

Determinado por el método del microhematocrito, centrifugando a 13.000 g x 5 minutos (279), este valor fue expresado en porcentaje.

***Estudio de algunas variables de la Hemostasia Primaria***

***Observación microscópica de las plaquetas (tamaño y forma)***

Fue realizada inmediatamente después de extraída la muestra, con el fin de prevenir que sucedieran cambios en la morfología plaquetaria. Se hicieron extendidos de sangre periférica recolectada con EDTAK<sub>3</sub> en láminas portaobjetos, fijándolos con metanol y coloreándolos con Hemacolor. Se examinaron las características morfológicas de las plaquetas bajo microscopio de luz con el objetivo de inmersión 100 X.

***Recuento de plaquetas***

Fue realizado mediante el método de Brecher y Cronkite (40), utilizando la cámara de recuento de Neubauer modificada, diluyendo 1:100 la sangre recolectada con EDTA-K<sub>3</sub> en una solución de oxalato de amonio al 1% (Merck).

***Agregación plaquetaria***

Se ensayó en sangre total citratada, por el método de agregometría electrónica por impedancia, desarrollado por Cardinal y Flower (49), en un lumiagregómetro de doble canal, modelo 560-Ca (Chrono-log Corp. Havertown, EUA), según el protocolo descrito en el manual de instrucciones del equipo (56).

La sangre a analizar se dejó en reposo durante 1 hora a TA. En una cubeta de ensayo del lumiagregómetro se dispensaron 450 µL de sangre citratada y se le añadieron 450 µL de SSF (previamente calentada a 37°C). La cubeta se colocó en el canal de lectura del lumiagregómetro y se incubó durante 5 minutos a 37 °C, agitándola a 1.200 rpm, durante todo el experimento. Se indujo la agregación plaquetaria con colágeno de tendón equino (Horm- Nycomed Amersham-Munchen), a una concentración final de 5µg/mL. Se registraron los cambios de impedancia durante 10 minutos, tiempo en que se alcanzó la amplitud máxima. Estas variaciones de impedancia fueron expresadas en ohmios (Ω), reportándose la amplitud máxima de la respuesta de agregación. También se hicieron mediciones del área bajo la curva (A), del tiempo de

latencia (L) y de la pendiente de la curva (P). Este ensayo fue realizado en el Laboratorio de Fisiopatología de la Coagulación Sanguínea del Centro de Medicina Experimental (IVIC).

#### ***Secreción de ATP por las plaquetas caninas***

Se determinó por medio de un ensayo sensible de bioluminiscencia utilizando el método de impedancia (o resistencia eléctrica) en un lumiagregómetro de sangre completa con doble canal, modelo 560-Ca<sup>2+</sup> y AGGRO/LINK®, Windows® Software (Chrono-log Corp., Havertown, PA). Se utilizó un kit de Chrono-lume™, que contiene los reactivos de luciferina y luciferasa (Chrono-log Corp., Havertown, PA).

Para prevenir la estimulación plaquetaria se diluyó previamente el reactivo de Chronolume 1:2 con SSF (156), para ser utilizada como solución de trabajo. También se preparó antes del ensayo una solución estándar de ATP (Sigma, St. Louis, EUA) diluida en una solución tampón de Hepes 50 mM, verificándose su integridad por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El protocolo que se siguió para este ensayo fue el sugerido por el fabricante con algunas modificaciones. En una cubeta con un volumen de 450 µL de SSF precalentada a 37 °C se le añadieron directamente 450 µL de sangre citrada, incubándose durante 10 minutos a 37 °C, con agitación a 1.200 rpm. Se dispensaron 100 µL del Chronolume diluido y se incubó a 37 °C en el agregómetro durante 2 minutos exactos, adicionando inmediatamente el agente inductor de agregación y secreción.

La determinación de la secreción de ATP fue ensayada utilizando como agente inductor de la agregación y secreción al colágeno (Horm- Nycomed Amersham-Munchen) en una concentración final igual a 5 µg/mL. La cantidad máxima de ATP secretable (secreción máxima) de los gránulos densos de las plaquetas fue inducida con trombina (Sigma St. Louis, EUA) en una concentración final de 1U/mL.

Se midió el cambio de luminiscencia de las muestras problema y de la solución de ATP de concentración conocida. Los resultados de la secreción de ATP de las muestras de sangre se reportan en nanomoles de ATP y fueron comparados con aquellos obtenidos de un estándar de 2 nmoles de ATP (concentración final en la cubeta = 2µM). Además, estos resultados fueron normalizados a  $1 \times 10^{11}$  plaquetas, de forma que también se reportan los valores como µmoles de ATP/ $10^{11}$  plaquetas, siendo esto

esencial debido a la variación en el número de plaquetas de los animales a lo largo del ensayo (72). Estos ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Fisiopatología y Coagulación Sanguínea del Centro de Medicina Experimental del IVIC.

#### ***Evaluación del factor von Willebrand (FvW)***

Se realizó la determinación cuantitativa de los niveles de antígeno del FvWAg en plasma antes y después de la inoculación con *A. platys*, por medio de una técnica de ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo, que permite cuantificar el FvWAg como proteína, sobre la base de sus propiedades antigénicas frente al correspondiente antisuero.

Se recolectaron con citrato de sodio al 3,8% (proporción 1/9), 2mL de sangre venosa de los animales, centrifugándose a 1500 x g durante 15 minutos a 4°C, separando el PPP rápidamente. Este plasma fue congelado a -80°C hasta el día del ensayo. El día del ensayo los plasmas fueron descongelados inmediatamente antes del análisis, de forma rápida a 37°C, a fin de evitar la formación de crioglobulinas.

El procedimiento del ELISA tipo sándwich se llevó a cabo en ocho pasos: el paso 1: es la adsorción pasiva del anticuerpo a la placa. Se recubrió una microplaca (Maxisorp-Nunc Internacional, NY, EUA) con anticuerpo policlonal de conejo anti FvW humano (Dako, A/S Producttitionsvej, Glostrup, Dinamarca), diluido en buffer carbonato 50 mM pH 9,6 toda la noche a 4°C.

El paso 2: consistió en realizar cinco lavados de los pozos con Tween 20 (0,05%)/PBS 0,01M pH 7,2 para remover el exceso de anticuerpo no unido, en un lavador de placas (Modelo ELx50, Bio-Tek Instrument, Highland Park, Vermont, EUA). En el paso 3 se adicionó el antígeno (FvW), se prepararon diluciones 1:51 de cada plasma de los perros con SSF y Tween 20 al 0,05%, y cuatro diluciones de un plasma calibrador con 98% de FvW humano (Dade<sup>®</sup>, Behring GmbH, EUA).

Se dispensaron 100 µL de estas diluciones de plasma problema y 100 µL del plasma calibrador puro, equivalente a 98% de FvW en sus respectivos pozos de la microplaca. También se dispensó en dos pozos solución de SSF/Tween 20 al 0,05% como blanco y un control interno de FvW de concentración conocida (Dade<sup>®</sup>, Behring GmbH, EUA). Se incubó la microplaca tapada durante 1 hora a TA. En el paso 4: se realizaron lavados similares a los descritos en el paso 2. El paso 5 consistió en la

adición de anticuerpo anti FvW, conjugado con la enzima peroxidasa (Dako, A/S Producttitionsvej, Glostrup, Dinamarca) a cada pozo de la placa, incubándose durante 1 hora a TA. El paso 6 consistió en lavar cuatro veces los pozos con una solución de Tween 20 (0,05%) /PBS 0,01M pH 7,2 y una vez con tampón citrato 0,1M pH 5. En el paso 7 se adicionó el sistema desarrollador de color, añadiéndose 100 µL de o-fenilendiamina (Invitrogen, EUA), se incubó en la oscuridad durante 5 minutos, deteniéndose la reacción añadiendo 150 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N a cada pozo. Con el paso 8 se procedió a la lectura, midiéndose la DO (492 nm) de cada pozo en un lector de microplaca (Modelo ELx800 Bio-Tek Instruments, Highland Park, Vermont, EUA).

La concentración de FvWAg plasmático fue determinada mediante una curva de calibración generada con las lecturas que arrojaron las diluciones del plasma calibrador comercial conteniendo 98% de FvW humano. Los porcentajes del FvWAg de las muestras de los Beagles se obtuvieron interceptando las absorbancias de las muestras con la curva de calibración y extrapolando los puntos de corte obtenidos hacia la abscisa (% FvW). Esta prueba fue desarrollada en el Laboratorio de Investigación del Banco de Sangre Municipal del Distrito Capital, Caracas.

### ***Estudio de algunas variables de la Hemostasia Secundaria***

#### ***Tiempo de protrombina (TP)***

Se realizó por el método de Quick (234). Cada plasma citratado fue ensayado por duplicado con el reactivo Neoplastine®CI Plus<sup>5</sup> (Diagnostica Stago, Asnieres, Francia) y las lecturas de los tiempos de coagulación se realizaron en un analizador semiautomatizado de coagulación (Modelo ST4, Diagnostica Stago, Asnieres, Francia). Los resultados fueron expresados en segundos.

#### ***Tiempo de trombolastina parcial activada (TTPa)***

Se utilizó el reactivo C.K. Prest ®CI Plus<sup>5</sup> (Diagnostica Stago, Asnieres, Francia) según Proctor y Rapaport (233), las lecturas de los tiempos de coagulación se realizaron en un analizador semiautomatizado de coagulación (Modelo ST4, Diagnostica Stago, Asnieres, Francia). Los resultados fueron expresados en segundos.

#### ***Concentración de fibrinógeno plasmático (Factor I)***

Se realizó por el método gravimétrico descrito por Ingram (147), utilizando cloruro de calcio 0,025M (Sigma Chemical Company). La concentración de fibrinógeno

fue expresada en mg/dL, según los valores obtenidos luego de utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de fibrinógeno} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{peso del coágulo}}{\text{volumen del plasma (mL)}} \times 100$$

#### ***Determinación del Factor XIII***

Por medio de la técnica de solubilidad del coágulo de fibrina en urea 5M, descrita por Loewy y Edsall (190). Los resultados se expresan como disolución o no del coágulo en 24 horas. La prueba se considera normal cuando éste no se solubiliza en 24 horas.

#### ***Evaluación de algunas variables de la Fibrinólisis***

##### ***Determinación semicuantitativa del dímero D***

Fue medida la concentración plasmática de fragmentos de dímero D, contenidos en los productos de degradación de la fibrina entrecruzada (XL-PDF) como marcador de fibrinólisis, mediante un ensayo de aglutinación con perlas de látex recubiertas con un anticuerpo monoclonal altamente específico contra el dímero D (139), utilizando la prueba de DIMERTEST® (Dade®, Behring GmbH, EUA).

Se ensayaron las muestras problema, el control positivo (solución de dímero D humano en una concentración aproximada de 800 ng/mL) y el control negativo. Esta prueba permite medir concentraciones de dímero D de 200 ng/mL en adelante. Los resultados son expresados como negativos (menor de 200 ng/mL de dímero D (XL-FDP) o positivo (mayor de 200 ng/mL de dímero D (XL-FDP)).

##### ***Tiempo de lisis del coágulo de euglobulina***

Se realizó mediante el método de Von Kaulla y Schultz (301). El plasma es diluido y acidificado, formándose un precipitado que contiene fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, y activadores del plasminógeno. Este precipitado se llama fracción de euglobulina. Excluidas del precipitado están las antiplasminas, así que la fibrinólisis puede proceder. Se forma un coágulo y se inicia el tiempo de incubación entre 1 a 5 horas, se observa si hay disolución del coágulo.

Todos estos ensayos (hematología, hemostasia y fibrinólisis) se realizaron en el Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular del CBB del IVIC.

##### ***Detección de la presencia de inmunoglobulina G asociada a plaqueta (IgGAP)***

Para descartar que una de las causas de la trombocitopenia estuviera relacionada

con un mecanismo inmune mediado por anticuerpos, se midieron los anticuerpos antiplaquetas. La determinación se realizó mediante la medición de anticuerpos IgG circulantes en el suero y con capacidad de unirse a las plaquetas (IgGAP), por la técnica de Grindem *et al.* (119).

Primero se realizó una estandarización de la técnica para determinar anticuerpos (Ac) antiplaquetas en suero de caninos, por citometría de flujo. Posteriormente se ensayaron los sueros problema, requiriéndose para esto la obtención de plaquetas de un perro sano. Para purificar las plaquetas caninas se realizó la extracción de 5 mL de sangre venosa de un perro sano en reposo y con el mínimo traumatismo posible, trasvasándola a un tubo conteniendo EDTA-K<sub>3</sub>, y se centrifugó a 170 x g durante 5 min, obteniendo el PRP.

Este PRP se dispensó en un tubo de plástico, lavándose las plaquetas tres veces con PBS-EDTA 3mM-BSA 0,1%, pH 7,2 y centrifugando la suspensión de plaquetas a 1.400 x g por 10 min a TA, para remover las proteínas plasmáticas. El EDTA previene de forma adecuada, la activación *ex vivo* de las plaquetas caninas (207).

Las plaquetas lavadas fueron fijadas con formaldehído a una concentración final de 0,24% en PBS y se incubaron a TA durante 30 min. (132). Después de la incubación fueron lavadas dos veces con PBS-EDTA 3mM-BSA 0,1%, como se explicó anteriormente. Luego se decantó el sobrenadante y el botón celular, compuesto por las plaquetas ya fijadas fue resuspendido suavemente en 1mL de PBS-EDTA 3 mM. A estas plaquetas fijadas y lavadas se les realizó un recuento, ajustándose a 100.000 /  $\mu$ L.

Para la obtención del suero se extrajeron 3 mL de sangre venosa de los caninos sanos e infectados con *A. platys* en tubos al vacío sin anticoagulante, dejando reposar la muestra por 1 hora a TA. Posteriormente se centrifugó a 1.400 x g por 10 min. Cada suero fue separado e inactivado con calor a 56 °C durante media hora, almacenándolos en viales plásticos de 1,8 mL y congelándolos a -20 °C hasta su procesamiento para el montaje de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), con la finalidad de medir anticuerpos antiplaquetas.

Se ensayaron cuatro clases diferentes de controles. Se utilizó un control positivo que consistió en suero de un canino trombocitopénico (5.000 plaquetas/  $\mu$ L) y que presentaba petequias en casi todo el cuerpo (Consultorio privado del Médico Veterinario

Gabriel Verde, de La Candelaria, Maracay, Estado Aragua). Como control negativo se utilizó el suero de un canino clínicamente sano. Además de estos dos controles se corrió un control isotipo que consistió de un Ac isotipo, IgG de conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson Immuno Research Laboratorios, EUA) para detectar unión inespecífica de anticuerpo IgG exógena, a las plaquetas caninas. Las plaquetas del perro sano fueron incubadas con este anticuerpo.

En el análisis de la fluorescencia emitida por fluorocromos añadidos a las células, debe tenerse en cuenta la fluorescencia celular intrínseca o autofluorescencia, que es causada, principalmente, por nucleótidos de pirimidina y flavina. Estas moléculas confieren fluorescencia azul o verde de baja intensidad a las células, cuando son excitadas por luz ultravioleta o azul. Por este motivo también se montó un control de autofluorescencia, el cual se preparó mezclando en un tubo la suspensión de plaquetas sanas en tampón sin anticuerpo.

Para el marcaje de las plaquetas con anti-IgG canina-FITC se aplicó una técnica de IFI para la detección de los IgGAP, que pudieran estar presentes en el suero de los Beagles. Se procedió a la incubación de las plaquetas del perro sano con el suero de cada canino, para lo cual, los sueros fueron descongelados a 37 °C de forma rápida.

En cuatro tubos plásticos se colocaron 100 µL de una suspensión de plaquetas del perro sano (100.000/ µL) lavadas y fijadas. A uno de los tubos se le adicionaron 100 µL de Ac isotipo, al segundo tubo se le dispensó suero control positivo, en otro tubo 100 µL de suero control negativo y al último tubo 100 µL de suero del animal infectado experimentalmente. Los tubos se incubaron por 30 min a TA.

Para la incubación con el conjugado fluorescente, cada muestra fue lavada dos veces con 3 mL de PBS-EDTA 3mM-BSA 0,1%, pH 7,4, centrifugando a 1.400 x g por 5 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante. Posteriormente, a cada muestra se le añadieron 100 µL de anticuerpo policlonal, anti-IgG (H+L) canina (producida en conejo), conjugado a FITC (Jackson Immuno Research Lab, EUA), a una dilución de 1/50 con PBS, siendo incubadas durante 30 min a TA en la oscuridad.

Posteriormente, as muestras fueron lavadas 2 veces, como se indicó antes, para eliminar las proteínas plasmáticas e IgG-FITC no unida, finalmente fueron resuspendidas con 1 mL de PBS, conservadas en refrigeración y en la oscuridad, por un

resuspendidas con 1 mL de PBS, conservadas en refrigeración y en la oscuridad, por un tiempo no mayor de 18 horas, hasta su lectura. Todos los tubos con muestras problema y controles fueron conservados de la misma forma.

Por último se detectaron los IgGAP por citometría de flujo. Las plaquetas fluorescentes fueron medidas, por medio de un citómetro de flujo, FACS-Calibur (Becton-Dickinson, San José, EUA) del Laboratorio de Patología Celular y Molecular del Centro de Medicina Experimental, del IVIC. Se definió una región para separar la población de plaquetas, por tamaño (FSC) y granularidad (SSC). Para el análisis de las plaquetas se establecieron los siguientes parámetros logarítmicos: FSC-E00, SSC: 433 volts y FL1 562 volts.

Las plaquetas fueron identificadas por sus características FSC/SSC; diez mil eventos (10.000) fueron adquiridos (excluyendo detritus celular) y los resultados fueron analizados con el programa CELL Quest. El porcentaje de plaquetas positivas que fueron recubiertas con IgG fue definido por las células totales en la región 1 (R1) y ubicadas en el cuadrante positivo para fluorescencia FL1. La IgG sérica con capacidad de unirse a la superficie de las plaquetas (IgGAP) fue corregida sustrayendo la fluorescencia inespecífica (background), medida incubando las plaquetas con el anticuerpo control isotipo.

#### ***Análisis estadístico***

Para cada variable estudiada se comprobaron los supuestos estadísticos básicos, normalidad, a través de la prueba de Wilk-Shapiro y, homocedasticidad, por medio de la Prueba de Barlett, y se transformaron la(s) variable(s) que no cumplieron estos supuestos. Con la finalidad de dar cumplimiento a los objetivos específicos, los datos fueron sometidos al análisis de la varianza, a los fines de detectar posibles diferencias significativas en las variables (hemoglobina, hematocrito, CHCM, recuento de leucocitos, recuento diferencial de leucocitos, recuento de plaquetas, agregación plaquetaria, secreción plaquetaria, FvWAg, TP, TTPa, fibrinógeno, FXIII, dímero D, tiempo de lisis de euglobulina y IgGAP) en función del porcentaje de bacteriemia y de los días postinoculación. De acuerdo a la significación de los análisis de la varianza, se condujeron pruebas de comparación de medias de Tukey a un nivel de significación del 5%. Se utilizó el programa computarizado Statistix para la realización de estos análisis.



## RESULTADOS

### CAPÍTULO I

#### **Obtención del inóculo de *Anaplasma platys* Maracay a partir de perros infectados con esta rickettsia**

##### ***Análisis sanguíneos y clínicos de los perros de donde se obtuvo el inóculo de *A. platys* Maracay***

El aislado de *A. platys* utilizado en la segunda etapa del trabajo procede en una primera instancia del PRP de una cachorra pastor alemán de San Joaquín, Estado Carabobo, con 15% de bacteriemia (porcentaje de plaquetas infectadas) para *A. platys* y negativo a *Ehrlichia canis*, ambos determinados por frotis de capa blanca (FCB). Los análisis clínicos y del laboratorio del perro se reportan en la Tabla III.

Se probó la efectividad de este aislado (primer aislado) inoculándolo en tres perros mestizos, obteniendo 99% de bacteriemia por *A. platys* en uno de ellos y una mas leve bacteriemia por *A. platys* en los otros dos (30 y 1%). En la Tabla IV puede observarse el registro diario de la temperatura rectal, concentración de hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas y de leucocitos y porcentaje de bacteriemia del perro mestizo infectado experimentalmente con *A. platys*, que llegó a alcanzar 99% de bacteriemia, determinada por medio del examen de los FCB.

El PRP (20 mL) obtenido de este perro constituyó el inóculo (aislado amplificado) utilizado para infectar a los 6 perros Beagles en la segunda etapa del trabajo, siendo necesario demostrar la presencia del ADN de *A. platys* en el mismo.

##### ***Análisis del aislado amplificado de *A. platys* obtenido en Maracay (Aragua)***

##### ***Microscopía electrónica (MET)***

La MET permitió esclarecer que las inclusiones observadas dentro de las plaquetas, en los FCB teñidos, eran realmente organismos rickettsiales tipo *A. platys*, en lugar de colorante precipitado, restos de núcleos de megacariocito y/o gránulos

**Tabla III. Análisis sanguíneo, coprológico y clínico realizado en el Hospital Daniel Cabello de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV, a una cachorra pastor alemán, de la que se obtuvo el aislado de *Anaplasma platys* utilizado para inducir la infección en los tres perros criollos, en el presente trabajo**

<b>Hematología</b>		<b>Química sanguínea</b>	
<b>Variables</b>	<b>Resultados</b>	<b>Variables</b>	<b>Resultados</b>
recuento de leucocitos	14,2 x 10 <sup>3</sup> /μL	albúmina	2,4 g/dL
recuento de eritrocitos	5,33 x 10 <sup>6</sup> / μL	proteínas totales	5,4 g/dL
hemoglobina	11 g/dL	globulinas	3,0 g/dL
hematocrito	34%	fosfatasa alcalina	174 U/L
número de plaquetas	206 x 10 <sup>3</sup> /μL	creatinina	0,9 mg/dL
monocitos	18%	bilirrubina total	2,2 mg/dL
linfocitos	14%	índice ictérico	75 U
neutrófilos	67%		
basófilos	---		
eosinófilos	1%		
VCM	63,7 fL		
CHCM	33,3 g/dL		
HCM	21 pg		
Wo	negativo		
<b>Despistaje de</b>		<i>Anaplasma platys</i>	15%
(frotis de capa blanca)		<i>Ehrlichia canis</i>	negativo
		<b>Coprología</b>	
		esteatorrea, abundante flora bacteriana, huevos de <i>Ancylostoma</i>	
		<b>Anamnesis</b>	
		edad: 3 meses. peso: 7 kilos. temperatura: 38,7°C. dieta: alimento seco. heces: sanguinolentas y diarreicas, decaimiento, inapetencia, emaciación y vómito.	
		<b>Comentarios</b>	
		anisocitosis moderada, reticulocitos, monocitos reactivos, plaquetas reactivas	

**Tabla IV. Observaciones hematológicas y clínicas del perro criollo infectado experimentalmente con *Anaplasma platys*, que alcanzó un 99% de bacteriemia**

DPI	temperatura rectal (°C)	plaquetas / $\mu$ L	bacteriemia por FCB (%)	hematocrito (%)	leucocitos / $\mu$ L	recuento diferencial				observaciones
						S	L	E	M	
		410.000	negativo	30	13.250	60	39	-	1	administración oral de 1 tableta de 5mg de prednisona
		535.000	“	30	12.500	56	39	-	5	
<b>inoculación del aislado de <i>A. platys</i></b>										
2	39,7	540.000	negativo	32						
4		302.500	“	29	9.650					
6	40,4	280.000	“	32	6.550					
7	39,4	340.000	“	31	7.850					
8		330.000	“	26	8.725	79	19	-	5	eritrofagocitosis $\uparrow$
9	40,0	185.000	1 inclusión	24	13.300					
10	39,6	65.000	negativo	30						
11		168.000	positivo	29						
12		205.000	14	29						
13	39,9	188.000	90	32						
14	39,9	100.000	99	22						
15	39,9	28.000	99	15	10.025					inicio doxiciclina (100 mg/día)
17		47.000			20					

DPI = días postinoculación

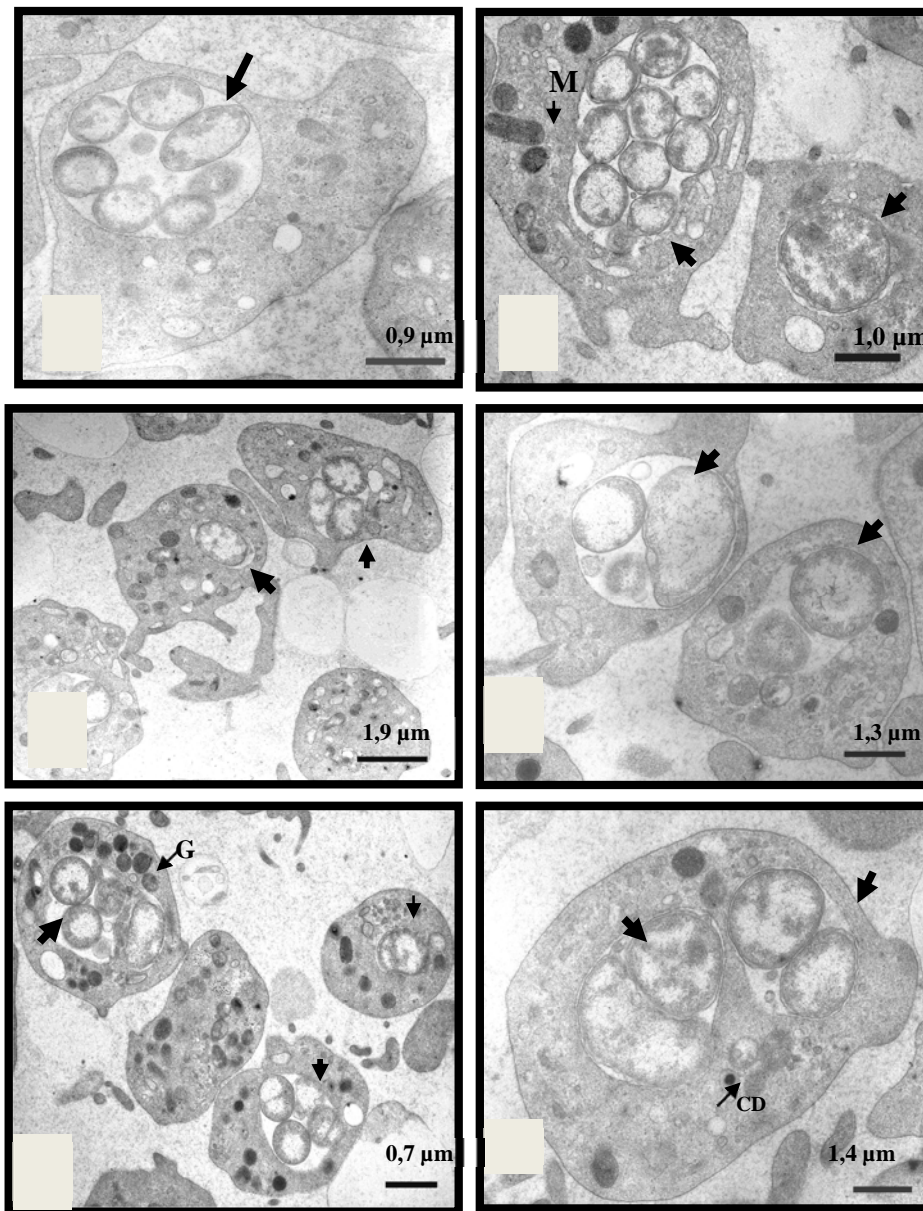
FCB = frotis de capa blanca. S = segmentados. L = linfocitos. E = eosinófilos. M = monocitos

plaquetarios agrupados y fuertemente condensados y coloreados. En la Figura 5 se evidencian los aspectos ultraestructurales de las plaquetas infectadas con *A. platys*. El estudio de MET mostró plaquetas que contenían en su interior organismos rickettsiales tipo *A. platys*, de diferentes tamaños y formas, residiendo en el interior de una vacuola. En las Figuras 5a y 5b son redondos u ovalados, mientras que en la Figura 5c, 5d y 5f se observa alguno con forma arriñonada, mostrando la doble membrana (una interna y otra externa) que caracteriza a estas rickettsias. Además se observaron organismos con una sola membrana. En la Figura 5 b puede apreciarse que el número de organismos dentro de la vacuola infectada fue de hasta nueve.

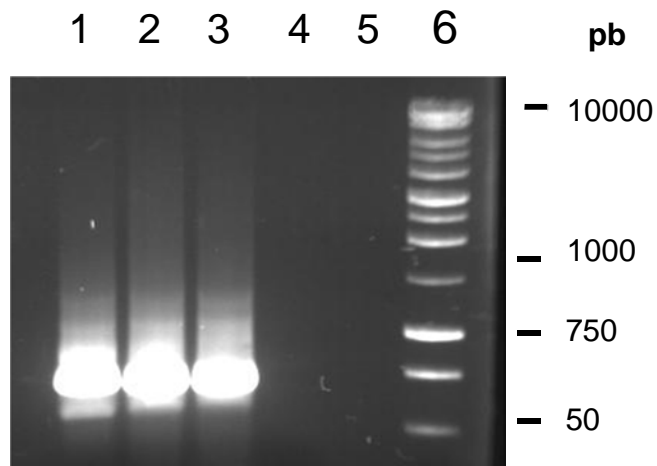
También pueden verse (Figura 5a) organismos de membrana delgada y protoplasma moderadamente electrondenso y organismos que presentaban un área electrontransparente o luminosa con finas fibrillas en el área central y una sustancia electrondensa en su periferia, además en la Figura 5 b pueden apreciarse dos plaquetas con uno de estos organismos, en donde la sustancia de color oscuro se disponía también en el centro del mismo. Se observa más de una vacuola dentro de una misma plaqueta (Figura 5e y 5f). En todas las plaquetas se aprecian pocos gránulos alfa y escasos gránulos densos, no observándose glucógeno. Todas las plaquetas infectadas presentaban dos o más pseudópodos (Figura 5c).

#### ***Prueba de biología molecular (PCR)***

Las muestras del ADN obtenido del aislado amplificado fueron analizadas por la técnica de la PCR simple, en una sola ronda, pudiéndose confirmar que las inclusiones en el interior de las plaquetas caninas eran *A. platys*. En la Figura 6 se muestra el resultado de la amplificación del ADN<sub>r</sub> 16S de *A. platys* por PCR. En los tres volúmenes de ADN ensayados se detectó el ADN de *A. platys*, en una banda gruesa (alta concentración), con un tamaño aproximado de 678 pares de bases (pb). En la Tabla V aparecen los resultados del diagnóstico de *A. platys* y de *E. canis* en los dos aislados obtenidos en Maracay (Aragua), analizados por FCB, MET y PCR.



**Figura 5.** Micrografías electrónicas de plaquetas de un perro infectado experimentalmente con *A. platys* Maracay. Se aprecian plaquetas con organismos de *A. platys* ovalados (a), redondos (b), arriñonados (d y f), dentro de una vacuola con simple (f) o doble membrana (b). Organismos de membrana delgada y protoplasma electrondenso (a). Organismos con un área electrontransparente con finas fibrillas en el centro y una sustancia electrondensa en su periferia. Organismos con la sustancia de color oscuro en el centro del mismo (b). Se observan hasta 9 organismos por vacuola (b), y más de una vacuola por plaqueta (f). Las plaquetas infectadas poseen pseudópodos (c). M= mitocondria , G=gránulos alfa, CD = cuerpos densos



**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de tres volúmenes distintos del ADNr 16 S de *Anaplasma platys* aislado del plasma rico en plaquetas de un perro mestizo de 7 meses de edad, infectado de forma experimental con *A. platys* Maracay. Canal 1: 1 µL de ADN; canal 2: 5 µL de ADN; canal 3: 8 µL de ADN; canal 4: control canino negativo; canal 5: control negativo (agua); canal 6: marcador de peso molecular de ADN de 10000 pb.

**Tabla V. Resultados del diagnóstico de *Anaplasma platys* y *Ehrlichia canis* de los dos aislados obtenidos en Maracay (Aragua), analizados por observación morfológica con microscopio de luz (FCB), microscopía electrónica de transmisión (MET) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Aislado	___ Características del perro donde se obtuvo el aislado ___					_ <i>Anaplasma platys</i> _			_ <i>Ehrlichia canis</i> _		
	Origen	raza	sexo	edad (meses)	infección	FCB (%)	MET	PCR	FCB (%)	MET	PCR
primero	San Joaquín (Carabobo)	Pastor alemán	hembra	3	natural	15	nd	nd	-	nd	nd
primer aislado amplificado	Maracay (Aragua)	Criollo	macho	7	experimental	99	+	+	-	nd	-

nd: no determinado

## CAPÍTULO II

### Efecto de la inoculación de *A. platys* Maracay sobre la hemostasia en seis Beagles

#### FASE DE PREINOCULACIÓN

##### *Diagnóstico de A. platys y de E. canis en los seis Beagles*

##### *Diagnóstico morfológico por microscopía de luz (FCB)*

Los Beagles utilizados en el presente trabajo fueron diagnosticados como negativos a anaplasmosis por *A. platys* por este método, ya que no se observaron inclusiones en las plaquetas de los Beagles estudiados en la fase de preinoculación.

Por otra parte, también fueron diagnosticados como negativos a ehrlichiosis por *E. canis*, ya que no fueron evidenciadas inclusiones intramonocíticas y/o intralinfocíticas en ninguno de los perros estudiados, antes de la inoculación del aislado de *A. platys* (Tabla VI).

##### *Diagnóstico de anticuerpos anti A. platys y anti E. canis (IFI)*

El diagnóstico anterior fue reforzado por la prueba de IFI, debido a que no se detectaron anticuerpos anti *A. platys* ni anticuerpos anti *E. canis* en la sangre de los animales estudiados antes de la inoculación del aislado (Tabla VI).

##### *Determinación de la temperatura óptima de hibridación de la PCR-anidada*

En la Figura 7 se aprecia el gradiente de temperaturas de hibridación estudiadas: 40, 44, 46, 51, 54, 56, 58 y 60°C para la PCR- anidada de *A. platys*. En base a este análisis se seleccionó la temperatura de 60 °C como la temperatura óptima de hibridación para la realización de esta PCR.

##### *Determinación de la sensibilidad de la PCR anidada*

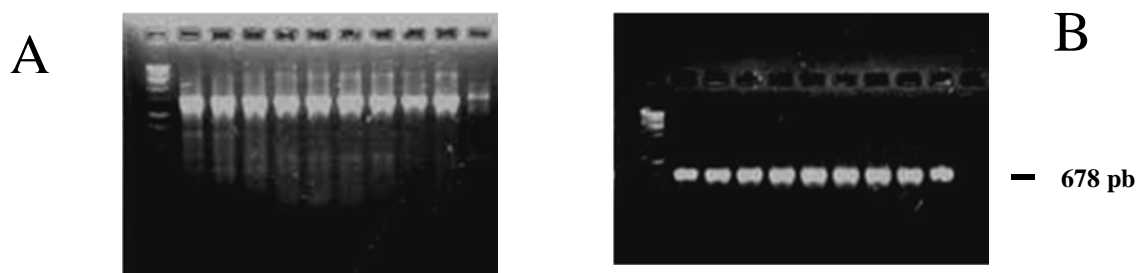
La Figura 8 muestra la sensibilidad de la PCR anidada con el par de cebadores PLATYS y EHR16SR, evidenciándose que la PCR utilizada fue capaz de detectar ADN de *A. platys* en una cantidad de 0,78 ng de ADN y, a juzgar por el tamaño de la banda, detectaría cantidades menores a ésta. Los productos de amplificación de la primera ronda se muestran en la Figura 8A y los fragmentos de ADN amplificado por PCR en la segunda ronda aparecen en la figura 8B.



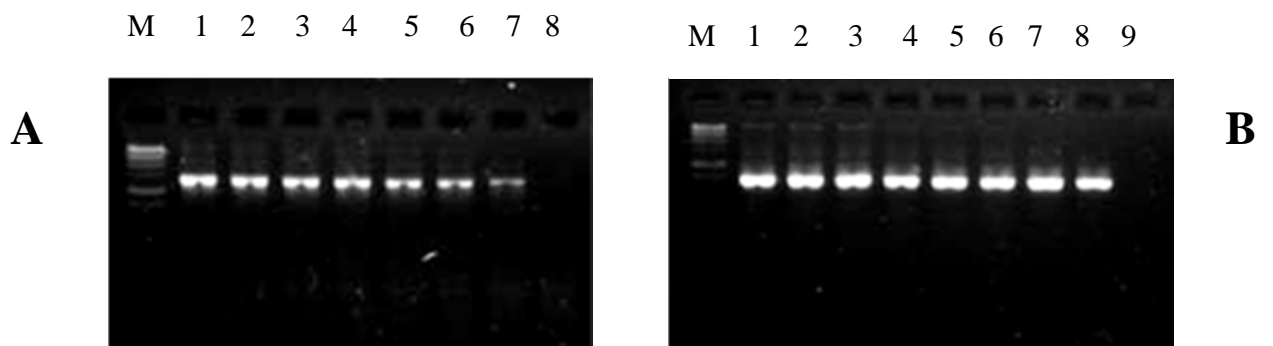
**Tabla VI. Resultados del diagnóstico de *Anaplasma platys* y *Ehrlichia canis* en seis Beagles de un año de edad, previo y posterior a la inoculación con *A. platys* Maracay, analizados por observación morfológica con microscopio de luz (FCB), por presencia de anticuerpos anti *A. platys* y anti *E. canis* (IFI) y por PCR**

Beagles	sexo	Fase de preinoculación						Fase de postinoculación					
		<i>Anaplasma platys</i>			<i>Ehrlichia canis</i>			<i>Anaplasma platys</i>			<i>Ehrlichia canis</i>		
		FCB	IFI	PCR	FCB	IFI	PCR	FCB	IFI	PCR	FCB	IFI	PCR
1	macho	-	-	nd	-	-	nd	+	+	+	-	-	-
2	“	-	-	nd	-	-	nd	+	+	+	-	-	-
3	“	-	-	nd	-	-	nd	+	+	+	-	-	-
4	“	-	-	nd	-	-	nd	+	+	+	-	-	-
5	hembra	-	-	nd	-	-	nd	+	+	+	-	-	-
6	macho	-	-	nd	-	-	nd	+	-	+	-	-	-

nd: no determinado



**Figura 7. Optimización de la temperatura de hibridación de los productos de PCR del ADN de *Anaplasma platys* Maracay en gel de agarosa. A) ronda 1 de la PCR anidada con el par de cebadores 8F/1448R de amplio rango (Familia *Anaplasmataceae*); B) ronda 2, mostrando los productos con el par de cebadores específicos para *A. platys* (PLATYS/EHR16SR): M marcador de peso molecular, canal 1: 40°C, Canal 2: 44°C, Canal 3: 46°C, Canal 4: 51°C, Canal 5: 54°C, Canal 6: 56°C, Canal 7: 58°C, Canal 8: 60°C, Canal 9: control positivo a 56°C, Canal 10: control negativo (agua). pb = pares de base**



**Figura 8. Sensibilidad de la PCR anidada. A) ronda 1 mostrando los productos de la PCR anidada de una muestra positiva a *A. platys* con el par de cebadores 8F/1448R de amplio rango (Familia *Anaplasmataceae*); M marcador de peso molecular, canal 1: 50 ng, canal 2: 25 ng, canal 3: 12,5 ng, canal 4: 6,25 ng, canal 5: 3,25 ng, canal 6: 1,56 ng, canal 7: 0,78 ng y canal 8 agua. B) ronda 2, mostrando los productos de la PCR con el par de cebadores específicos para *A. platys* (PLATYS/EHR16SR): M marcador de peso molecular, canal 1: 50 ng, canal 2: 25 ng, canal 3: 12,5 ng, canal 4: 6,25 ng, canal 5: 3,25 ng, canal 6: 1,56 ng, canal 7: 1,56 ng (repetido), canal 8: 0,78 ng y canal 9 agua.**

***Análisis de algunas variables de la hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis en los Beagles antes de la inoculación con A. platys Maracay***

Los valores preinoculación (controles) de las variables estudiadas se reportan en las mismas tablas que los obtenidos después de la inoculación, con el fin de poder hacer las comparaciones pertinentes.

**FASE DE POSTINOCULACIÓN**

***Diagnóstico de A. platys y de E. canis en los Beagles infectados experimentalmente con A. platys Maracay***

En la Tabla VI se presentan los resultados (pre y postinoculación) del diagnóstico de *A. platys* y de *E. canis* por las diferentes técnicas utilizadas: FCB, IFI y PCR.

***Diagnóstico morfológico por microscopía de luz (FCB)***

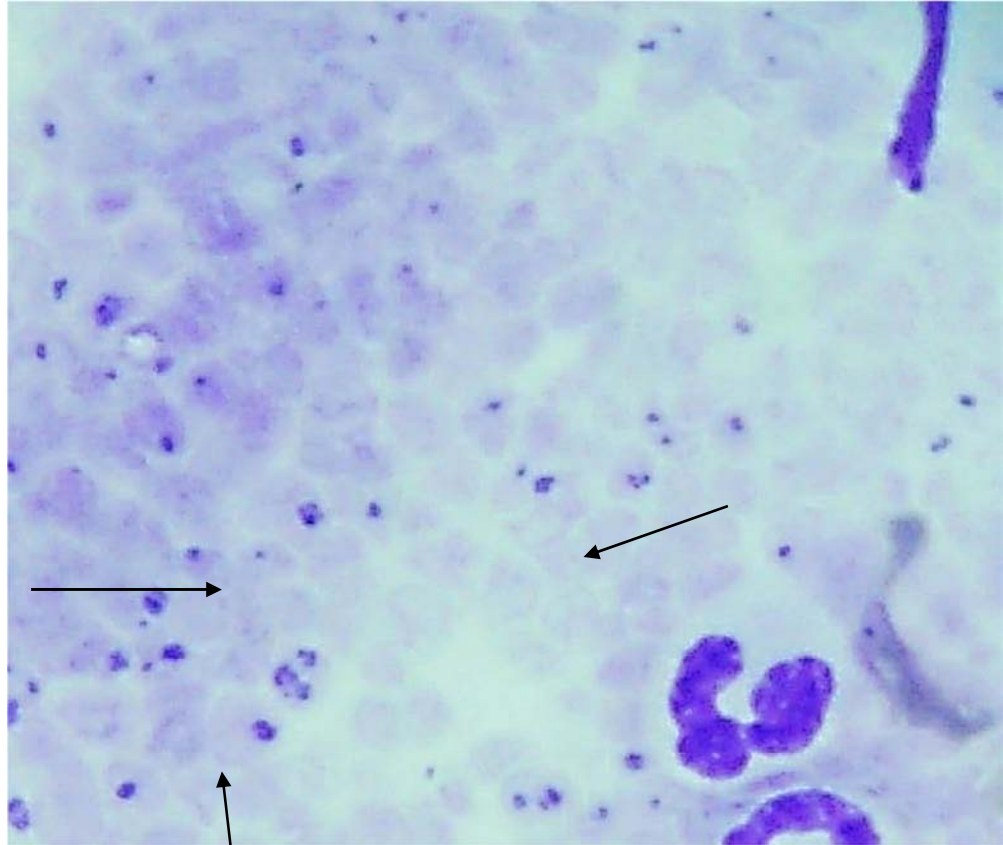
La observación mediante el microscopio de luz de los FCB teñidos de los Beagles, durante el tiempo que duró el ensayo (36 días), reveló que todos los perros fueron positivos a la infección por *A. platys* (Figura 9). Por otra parte, no se observaron inclusiones de *E. canis* en los leucocitos (monocitos o linfocitos), en ninguno de los seis perros estudiados, durante el tiempo que duró el ensayo.

***Diagnóstico serológico por inmunofluorescencia indirecta (IFI)***

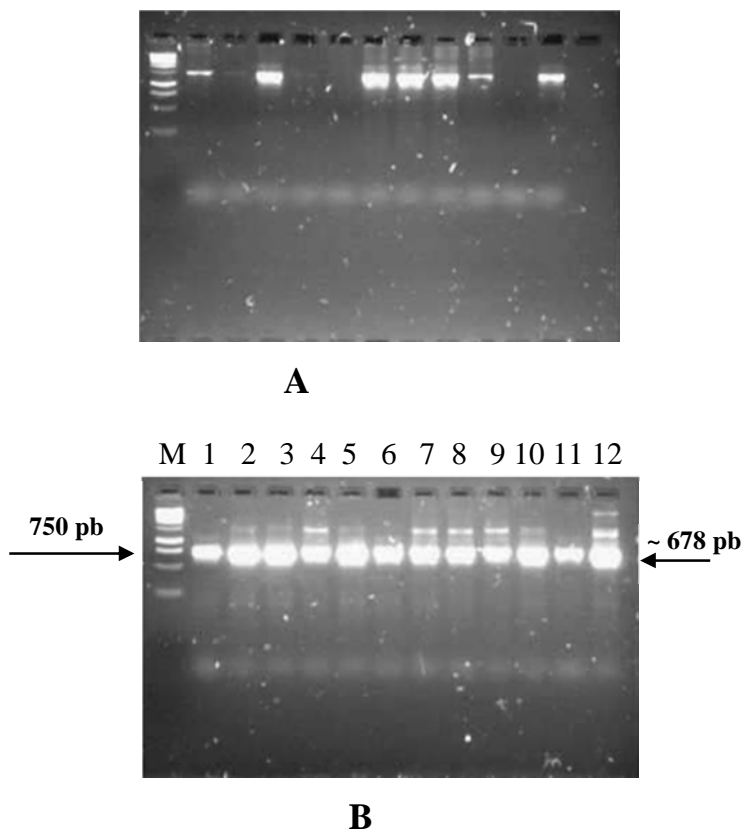
Todos los Beagles, excepto el identificado con el número seis (6), produjeron anticuerpos anti *A. platys* en una dilución >1:160, en la cuarta semana postinoculación, esta seroconversión de los perros corrobora la presencia del anaplasma en el inóculo obtenido en Maracay (Aragua). En cambio, ningún Beagle fue positivo a la prueba de IFI para *E. canis* después de la inoculación del aislado.

***Diagnóstico por biología molecular (PCR anidada)***

La Figura 10 revela la amplificación del ADN de *A. platys*, aislado del PRP de la sangre recolectada en la segunda y en la cuarta semana post-inoculación, de los Beagles, corroborando los resultados positivos a esta rickettsia, obtenidos por las anteriores técnicas diagnósticas. En la Figura 11A (primera ronda) se observa amplificación del ADN de *Anaplasma platys*. En la segunda ronda (B) no se amplificó ADN de *E. canis* en ninguna de las muestras (capa blanca) analizadas por PCR-anidada para *E. canis*, confirmándose la ausencia de *E. canis* en todos los Beagles.

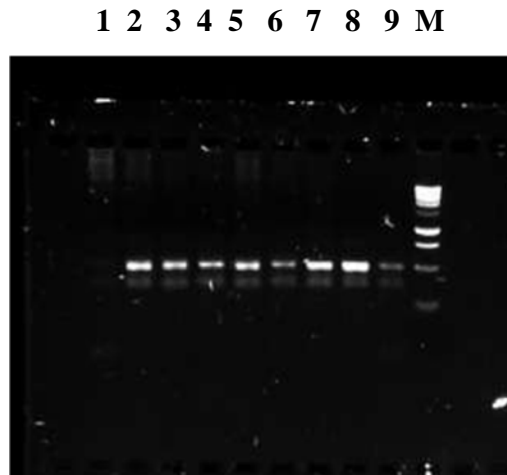


**Figura 9. Micrografía óptica del frotis de capa blanca teñido con Hemacolor, de la sangre de un perro Beagle infectado experimentalmente con *Anaplasma platys* Maracay. Se observan múltiples inclusiones intraplaquetarias basofílicas compatibles con *Anaplasma platys* (x 1000)**

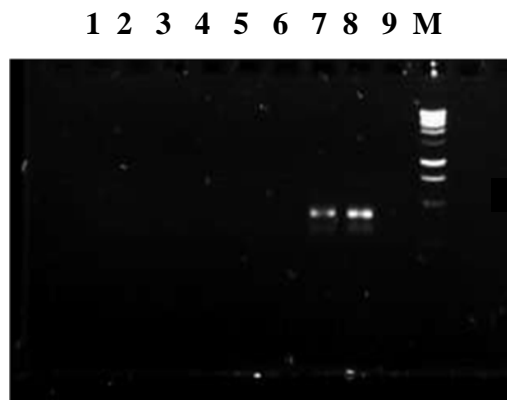


**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR-anidada de *Anaplasma platys* Maracay, amplificados del ADN aislado del PRP de seis perros Beagles, infectados experimentalmente con *A. platys* (2<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semana postinfección). A) ronda 1 de la PCR anidada con los cebadores 8F/1448R, de amplio rango (Familia *Anaplasmataceae*); B) ronda 2, mostrando los productos con los cebadores específicos para *A. platys* (PLATYS/EHR16SR).

M: marcador de peso molecular, canales del 1 al 6 contienen el ADN de los perros 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente, en la segunda semana post-infección; canales 8 al 13 contienen el ADN de los perros 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente, en la cuarta semana post-infección



A



B

**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR – anidada de *Ehrlichia canis*, amplificados del ADN aislado de la capa blanca (plaquetas y leucocitos) de seis perros Beagles infectados experimentalmente con *A. platys* Maracay en la 4<sup>a</sup> semana postinfección. A= Ronda 1 con el par de cebadores de amplio rango (Familia *Anaplasmataceae*) ECB/ECC. B = Ronda2 con el par de cebadores específico para *E. canis* (CANIS/HE3). Canales del 1 al 6 contienen el ADN proveniente de los Beagles del 1 al 6 respectivamente, canal 7: control positivo (5 µL de ADN de la sangre de un perro infectado con *E. canis* ) canal 8: control positivo (1 µL de ADN de células de cultivo infectadas con *E. canis* ), canal 9: control negativo (agua), canal M: marcador 1kb.**

### ***Comparación de la secuencia del ADNr 16S de A. platys Maracay con las secuencias publicadas en el Banco de Genes***

El resultado del análisis de la secuencia parcial de nucleótidos del gen ARNr 16S de *A. platys* Maracay, aislado del PRP de uno de los Beagles infectados, evidencia que tiene un 99,8 % de similitud con varias cepas de *A. platys* almacenadas en el GenBank. Además al comparar la secuencia parcial del gen ARNr 16S de la cepa Maracay con la secuencia de *A. platys* de las cepas venezolanas registradas (Tabla VII), pudo observarse que *A. platys* Maracay discrepó de *A. platys* Venezuela (n° AF287153 del GenBank) en el nucleótido ubicado en la posición 115, siendo T en lugar de C. Así mismo, *A. platys* Maracay difirió de *A. platys* Lara (n° AF399917 del GenBank), también en un solo nucleótido, en la posición 144, que fue A en lugar de G (Anexo 1).

### ***Análisis filogenético de A. platys Maracay***

El análisis filogenético mostró que *A. platys* Maracay está estrechamente relacionada con la cepa de *A. platys*, registrada en el Banco de Genes bajo el número de acceso: AF287153 de Venezuela (281), así como con otras cepas descritas en el mundo: EUA (M82801), Okinawa 1-Japón (AF536828), Okinawa-Japón (AY077619), Francia (AF303467) y China (AF156784), como se muestra en el árbol filogenético (Figura 12).

### ***Efecto de la inoculación de A. platys Maracay***

#### ***Patogénesis de la infección por A. platys Maracay***

El seguimiento del curso de la infección postinoculación del aislado de *A. platys* en los seis Beagles, mediante la observación de los FCB, reveló que todos los perros fueron positivos a *A. platys*, manifestando, una infección cíclica, con periodos alternos de bacteriemia y de recuperación.

El porcentaje de bacteriemia representado por el número de plaquetas infectadas con *A. platys*, fue registrado durante un periodo de observación de hasta 36 días en algunos de los animales. Los lapsos de tiempo correspondientes al periodo de incubación, picos de bacteriemia y periodos de recuperación difirieron para cada animal. Los porcentajes de bacteriemia obtenidos en los diferentes días postinoculación (DPI) de los seis Beagles fueron promediados y se presentan en la Figura 13.

En la Tabla VIII se presentan los rangos obtenidos de los porcentajes de plaquetas

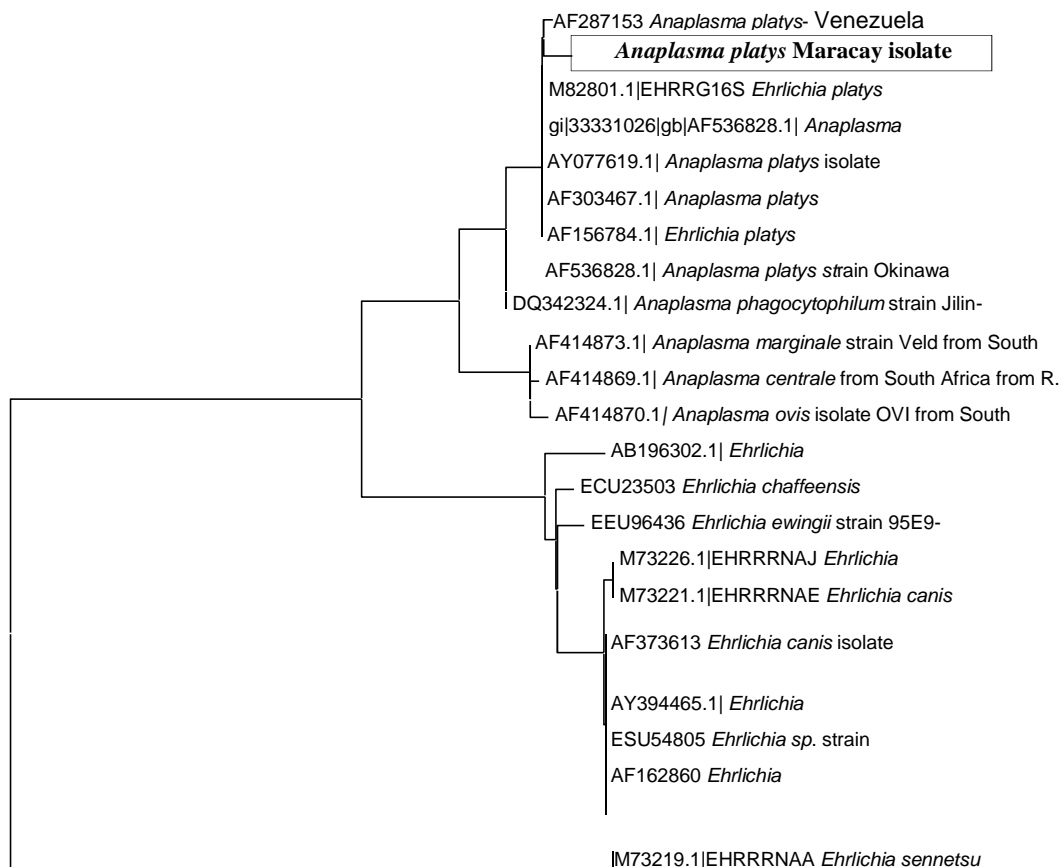


**Tabla VII. Comparación de la secuencia del ADNr 16S de la cepa *A. platys* Maracay (616 nucleótidos) con las secuencias del ADNr 16S de las cepas *A. platys* Venezuela y *A. platys* Lara**

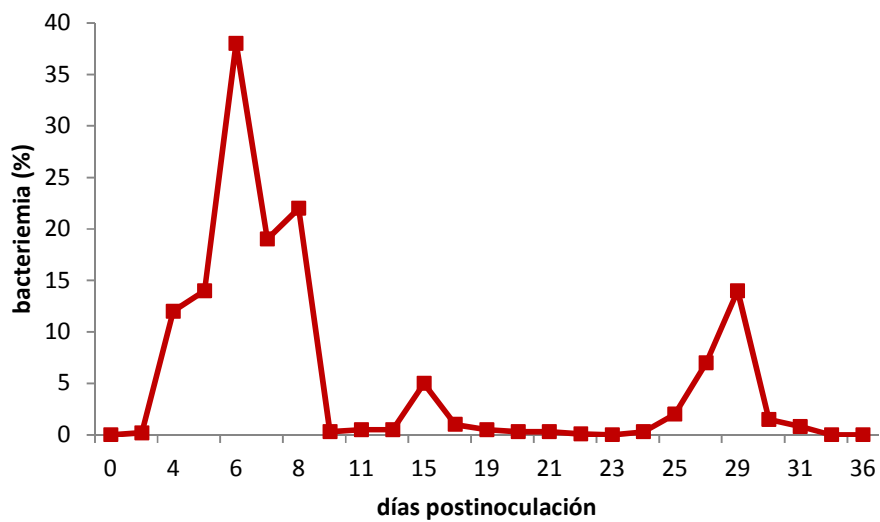
cepas venezolanas de <i>A. platys</i>	Número de acceso del GenBank	posición del nucleótido en que difieren las cepas:	
		115	144
Maracay	-----	T	A
Venezuela	AF287153	C	●
Lara	AF399917	●	G

La secuencia de *A. platys* Maracay fue utilizada como referencia para las posiciones de los nucleótidos.

El símbolo ● indica base idéntica a la cepa de referencia (nucleótido conservado)



**Figura 12.** Árbol filogenético basado en el ADNr 16S de *Anaplasma* y *Ehrlichia*. Secuencias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* fueron comparadas con el método Neighbor-Joining (NJ) operado mediante el programa MEGA (Kumar *et al.*) (172). En el lado izquierdo de cada cepa se muestra el número de acceso en el GenBank. Se utilizó a *Ehrlichia sennetsu*, ahora *Neorickettsia sennetsu* como el grupo externo. Se observa la estrecha relación filogenética entre *A. platys* Maracay con la cepa *A. platys* Venezuela y con otras cepas de *A. platys* de otros países.



**Figura 13.** Curso de la infección experimental por *Anaplasma platys* Maracay en seis Beagles de un año de edad. En la ordenada se presenta la bacteriemia (% de plaquetas infectadas). En la abscisa están representados los días postinoculación

**Tabla VIII. Categorización del curso de la infección experimental provocada con la inoculación de *Anaplasma platys* Maracay, en seis Beagles de 1 año de edad, diagnosticada morfológicamente por microscopía de luz (frotis de capa blanca)**

curso de la infección	n	% de bacteriemia	días postinoculación
1° pico	6	15- 38	4- 12
1ª recuperación	6	0 - 0,5	8 - 15
2° pico	6	1 - 9	11 - 19
2ª recuperación	6	0 - 0,3	15 - 23
3° pico	4	2- 14	24 - 33

promedios de bacteriemia = % de plaquetas infectadas

picos de bacteriemia = % de bacteriemia  $\geq 1$

recuperaciones de la infección = % de plaquetas infectadas  $\leq 0,5$

infectadas (bacteriemia) y sus respectivos DPI, de los seis Beagles estudiados, clasificando el curso de la infección en periodos de bacteriemia y en periodos de recuperación. Durante el periodo de tiempo estudiado, se presentaron tres picos de bacteriemia en los perros 1, 2, 4 y 5 y solo dos picos en los perros 3 y 6. Después de cada periodo de bacteriemia pudo apreciarse un periodo de recuperación, definido éste por un porcentaje menor de 0,5 % de plaquetas infectadas. Inmediatamente después de alcanzada la máxima bacteriemia, disminuye el porcentaje de plaquetas infectadas hasta valores cercanos al 0% (periodo de recuperación), extendiéndose entre 3 y 10 días, para volver a iniciar otro periodo de bacteriemia. El primer pico de bacteriemia fue mayor que el segundo y tercer pico.

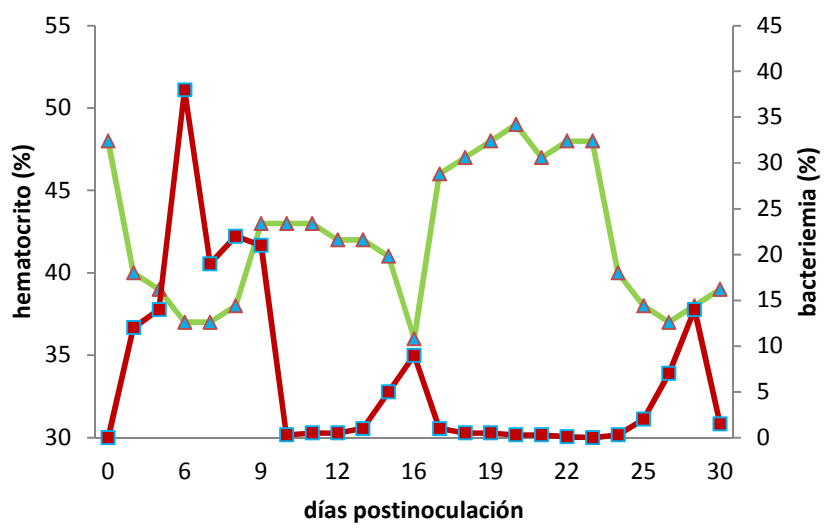
***Variables indicadoras de la infección aguda por Anaplasma platys Maracay: Hematocrito, recuento de plaquetas y temperatura corporal***

Estas variables fueron medidas frecuentemente durante el transcurso de la infección, sirviendo de esta manera para monitorear los picos de infección con *A. platys* y, así poder extraer de los Beagles la cantidad de sangre requerida para la evaluación del resto de las variables contempladas en los objetivos del trabajo.

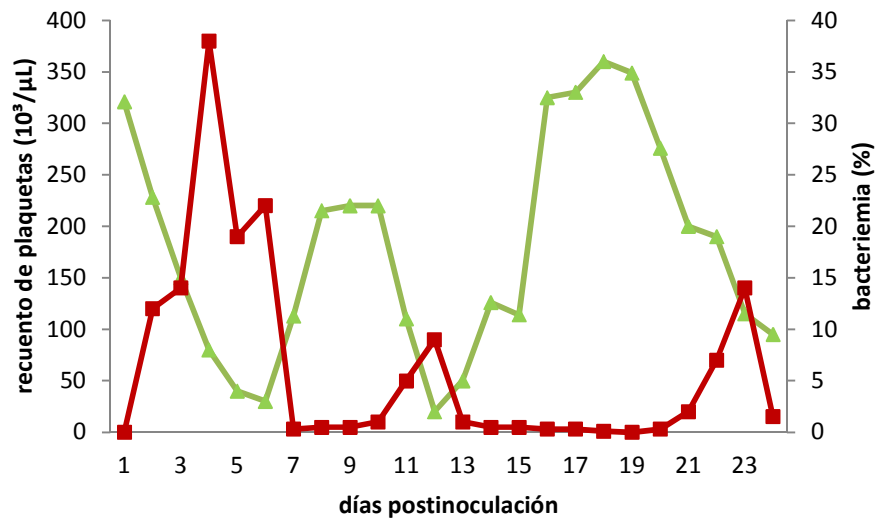
En la Figura 14 se presentan los valores promedio del hematocrito *versus* bacteriemia de los seis perros durante los 36 días del periodo de observación. En ella puede observarse de forma ilustrativa como fluctúa el valor del hematocrito durante todo el tiempo en que se estudió la infección. El hematocrito baja drásticamente durante el curso de los tres picos de bacteriemia y sube en los periodos de recuperación.

En la Figura 15 se presenta el recuento de plaquetas *versus* bacteriemia en el curso de la infección, pudiendo observarse que a medida que aumenta el porcentaje de plaquetas infectadas, lógicamente disminuye el número de plaquetas, alcanzando una dramática reducción cuando se llega al porcentaje máximo de plaquetas infectadas. El número de plaquetas registrado en los tres picos de infección llega a valores menores de 50.000 plaquetas / $\mu$ L. En los periodos de recuperación hay un aumento del número de plaquetas, pudiendo llegar a alcanzar el valor preinoculación e incluso superarlo, como ocurrió en los perros 1, 2, 4 y 5, o por el contrario, no pudiendo regresar a este valor basal, como es el caso de los perros 3 y 6.

La temperatura corporal en el transcurso de la infección se reporta en la Figura 16,



**Figura 14.** Efecto de la inoculación de *Anaplasma platys* Maracay sobre el hematocrito de seis Beagles de un año de edad. En la abscisa se presentan los días postinoculación. ■ = bacteriemia ▲ = hematocrito



**Figura 15.** Efecto de la inoculación de *Anaplasma platys* Maracay sobre el recuento de plaquetas en seis Beagles de un año de edad. En la abscisa se presentan los días postinoculación. ■ = bacteriemia ▲ = recuento de plaquetas

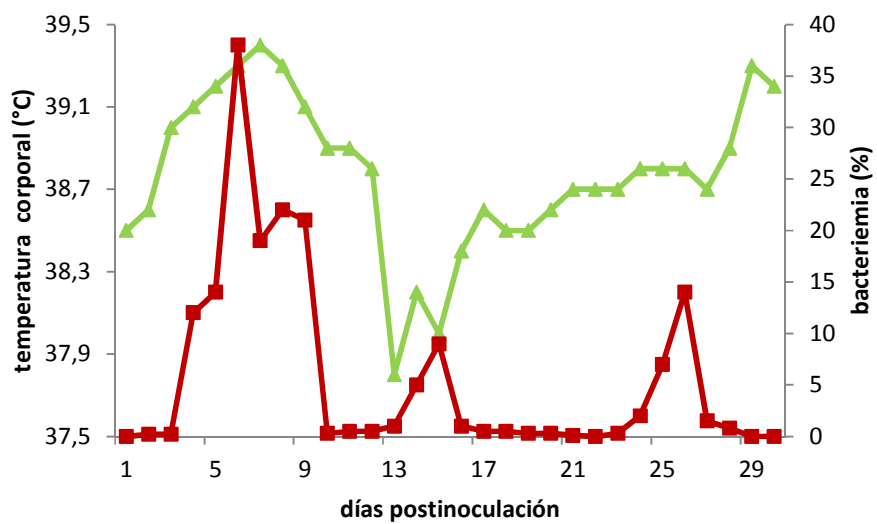


Figura 16. Efecto de la inoculación de *Anaplasma platys* Maracay sobre la temperatura corporal en seis Beagles de un año de edad. En la abscisa se presentan los días postinoculación. ■ = bacteriemia ▲ = temperatura



incrementándose en cada pico de bacteriemia. Todos los perros presentaron temperaturas rectales moderadamente elevadas (39,1-39,9) en el primer pico de bacteriemia, descendiendo ésta al disminuir el número de plaquetas infectadas. En los otros dos picos de bacteriemia el aumento de temperatura fue menor en comparación con el primero.

### ***Evaluación morfológica de las células en los frotis sanguíneos de los Beagles***

Después de la inoculación con *A. platys*, durante todo el transcurso de la infección, en especial en los picos de bacteriemia, pudieron ser observadas, en los FCB, células sanguíneas con las siguientes características: monocitos con vacuolas, seudópodos y citoplasma azul intenso, así como monocitos fagocitando eritrocitos (eritrofagocitosis). En cuanto a los linfocitos, presentaron algunos de ellos el citoplasma teñido de azul intenso. No se observaron mórulas en ninguno de los diferentes tipos de leucocitos examinados. Fueron evidenciadas células reticulares, algunas veces con eritrocitos y plaquetas atrapadas.

En cuanto a las plaquetas, su tamaño fue variado, desde macroplaquetas, que podían alcanzar el tamaño del eritrocito, hasta microplaquetas. El citoplasma de algunas de las plaquetas contenía una o más inclusiones. Fueron observadas plaquetas con los gránulos dispuestos en la periferia, tomando una forma anular. En cuanto a las plaquetas, se observó en todos los Beagles inoculados con *A. platys*, durante e inmediatamente después de los picos de bacteriemia, coincidente con la trombocitopenia, entre un 5 a un 30 % de macroplaquetas, llegando a alcanzar algunas el tamaño de los eritrocitos (macrotrombocitosis), así como también aumento del número de microplaquetas.

### ***Efecto de *A. platys* Maracay sobre algunas variables hematológicas***

Los resultados de las variables hematológicas: hematocrito, hemoglobina, CHCM, leucocitos y fórmula diferencial se muestran en la Tabla IX. Los valores presentados en esta tabla para cada una de las variables, representan el promedio de los resultados obtenidos para los seis Beagles, durante el curso de la infección experimental.

#### ***Hematocrito***

Hubo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del hematocrito en los dos primeros picos de bacteriemia al compararlos con el valor preinoculación, así como también con los valores obtenidos después de cada pico. El hematocrito alcanzó un valor semejante al obtenido en la preinoculación después del segundo pico de bacteriemia

**Tabla IX. Efecto de la inoculación experimental de *Anaplasma platys* Maracay sobre las variables hematológicas en seis perros Beagles de un año de edad**

<b>n</b>	<b>curso</b>	<b>bact</b>	<b>hematocrito</b>	<b>hemoglobina</b>	<b>CHCM</b>	<b>leucocitos</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>M</b>
	(días)	(%)	(%)	(g/dL)	(g/dL)	(x 10 <sup>3</sup> /μL)	(x 10 <sup>3</sup> /μL)			
6	preinoc	0	48 ± 1 a	17 ± 0 a	34 ± 1 ab	11,1 ± 1,1a	6,7 ± 0,3a	3,8 ± 0,3a	0,4 ± 0,1a	0,3 ± 0,1a
6	4-12	15-38	36 ± 2 c	13 ± 0 b	35 ± 1 ab	8,3 ± 1,3a	5,1 ± 0,5a	2,3 ± 0,4a	0,0 ± 0,0a	0,4 ± 0,1a
6	8-15	0-0,5	43 ± 1 b	16 ± 1 a	37 ± 2 a	12,5 ± 1,9a	7,0 ± 0,5a	4,8 ± 0,5a	0,4 ± 0,1a	0,5 ± 0,1a
6	11-19	1-9	38 ± 1 c	13 ± 1 b	34 ± 1 ab	9,3 ± 1,3a	5,5 ± 0,1a	3,3 ± 0,4a	0,3 ± 0,1a	0,2 ± 0,1a
6	15-23	0-0,3	48 ± 1 a	16 ± 1 a	33 ± 0 b	11,2 ± 0,8a	6,9 ± 0,2a	3,3 ± 0,3a	0,4 ± 0,2a	0,6 ± 0,1a

S= segmentados, L= linfocitos, E= eosinófilos, M= monocitos

curso = curso de la infección, preinoc = preinoculación, bact = bacteriemia

Promedio ± error estándar

a, b, c = letras diferentes equivalen a diferencias significativas (p< 0,05)

### ***Hemoglobina***

La concentración de hemoglobina descendió significativamente ( $p < 0,05$ ) en los dos primeros picos de bacteriemia con *A. platys*. Los resultados obtenidos en las recuperaciones se asemejaron al valor de hemoglobina preinoculación. La concentración de hemoglobina obtenida en los dos picos de infección también fue significativamente menor que la observada en los dos periodos de recuperación.

### ***CHCM***

No se observaron diferencias entre el valor preinoculación (valor control) y los valores obtenidos a lo largo de la infección por *A. platys*. Solo se evidenciaron diferencias significativas entre el valor de CHCM obtenido en la recuperación del primer pico de bacteriemia y el periodo de recuperación del segundo pico de bacteriemia, siendo este último significativamente menor.

### ***Leucocitos***

Se apreciaron disminuciones no significativas en el número de leucocitos en todos los picos de bacteriemia, al compararse con el valor obtenido en la fase de preinoculación, así como en los obtenidos en las dos recuperaciones.

### ***Recuento diferencial de leucocitos***

Hubo descensos no significativos de los segmentados y de los linfocitos en los dos primeros picos de infección.

### ***Efecto de A. platys Maracay sobre algunas variables de la Hemostasia Primaria***

Los resultados de las variables de la hemostasia primaria obtenidos aparecen en la Tabla X. Los valores presentados en esta tabla para cada una de las variables, representan el promedio de los resultados obtenidos para los seis Beagles durante el curso de la infección experimental.

### ***Recuento de plaquetas***

El número de plaquetas descendió significativamente en los dos picos de bacteriemia ( $p < 0,05$ ) al compararlos con el valor inicial. Como puede observarse en la Figura 15, inmediatamente después de cada valor máximo de bacteriemia el número de plaquetas continuó descendiendo, llegando a ser inferior a 50.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ .

### ***Agregación plaquetaria***

La agregación plaquetaria disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en los dos

**Tabla X. Efecto de la inoculación experimental de *Anaplasma platys* Maracay sobre el recuento plaquetario y la función plaquetaria en seis perros Beagles de un año de edad**

n	curso	bact	plaquetas x 10 <sup>3</sup> /μL	Agregación colágeno 5μg/mL Ω	A mm <sup>2</sup>	L minutos	P Ω/minuto	Secreción de ATP			
								colágeno 5μg/mL ___ nmoles de ATP ___	trombina 1U/mL _ μmoles ATP/10 <sup>11</sup> plaquetas_	colágeno 5μg/mL	trombina 1U/mL
6	preinoc	0	325 ± 25a	12 ± 0a	25 ± 3a	3 ± 0a	8 ± 0a	1,0±0,1 a	1,7 ± 0,1a	0,6 ± 0,1a	1,2 ± 0,2a
6	4-12	15-38	153 ± 33b	04 ± 2 c	10 ± 5a	6 ± 1a	3 ± 1a	0,4 ±0,1b	0,8 ± 0,2c	0,7 ± 0,1a	1,2 ± 0,2a
6	8-15	0-0,5	228± 43ab	10 ± 1ab	33 ± 6a	4 ± 1a	7 ± 1a	0,9 ±0,2a	1,6 ± 0,2ab	0,8 ± 0,2a	1,4 ± 0,1a
5	11-19	1- 9	170 ± 64 b	06 ± 2bc	25 ± 15a	5 ± 2a	7 ± 3a	0,4 ±0,1b	0,8 ±0,2bc	0,7 ± 0,1a	1,1 ± 0,2a

curso = días postinoculación, preinoc = preinoculación, bact = bacteriemia

A,L,P = área, latencia y pendiente de la curva de agregación plaquetaria

promedio ± error estándar

a,b,c = letras diferentes equivalen a diferencias significativas (p<0,05)

primeros picos de infección al compararlos con el valor de preinoculación. El resultado obtenido en la recuperación después del primer pico de infección se asemejó al valor preinoculación. El valor de agregación obtenido en el primer pico de infección también fue significativamente menor que el observado en el periodo de recuperación posterior. Este comportamiento similar entre el recuento plaquetario y la agregación plaquetaria durante el curso de la infección con esta rickettsia queda reflejado en la figura 17.

***Características de la curva de agregación plaquetaria (área bajo la curva, tiempo de latencia y pendiente)***

A pesar de que pudo apreciarse en el primer pico de infección una disminución, tanto del área bajo la curva, como de la pendiente de la curva de agregación plaquetaria, así como también un aumento del tiempo necesario para que las plaquetas se adhirieran a las fibras de colágeno (tiempo de latencia), estas variaciones no llegaron a ser estadísticamente significativas.

***Secreción de ATP por las plaquetas***

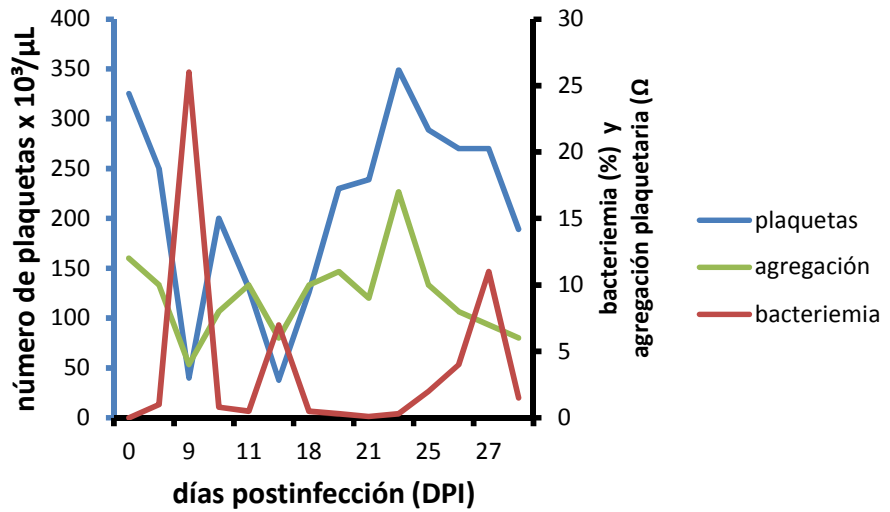
Se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la secreción plaquetaria de ATP inducida por el colágeno en los dos picos de bacteriemia, tanto al compararlos con el valor de preinoculación, como con el obtenido en la recuperación del primer pico de infección.

En cuanto a la secreción inducida por la trombina, disminuyó ( $p < 0,05$ ) en el primer pico de bacteriemia al compararse con el valor preinoculación y también con el valor obtenido en la recuperación después del primer pico de infección. Mientras que el descenso de la secreción plaquetaria obtenido en el segundo pico solo fue significativo al compararlo con el valor preinoculación.

Sin embargo, cuando los valores de secreción de ATP fueron corregidos por el número de plaquetas, desaparecieron las disminuciones significativas en los picos de bacteriemia, para cualquiera de los dos inductores utilizados.

***Factor vWAg***

No se observaron diferencias significativas en el FvW entre los valores obtenidos antes de la inoculación del aislado de *A. platys* y los valores del primer pico de infección (Tabla XI).



**Figura 17. Relación entre el recuento plaquetario y la agregación plaquetaria en Beagles de un año de edad infectados experimentalmente con *Anaplasma platys* Maracay**

**Tabla XI. Efecto de la inoculación experimental con *Anaplasma platys* Maracay sobre la concentración de fibrinógeno, el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), el factor von Willebrand (FvWAg) y el Factor XIII (FXIII) en Beagles de un año de edad**

<b>n</b>	<b>DPI (días)</b>	<b>bacteriemia (%)</b>	<b>fibrinógeno (mg/dL)</b>	<b>n</b>	<b>TP (segundos)</b>	<b>TTPa (segundos)</b>	<b>FvWAg (%)</b>	<b>FXIII</b>
6	preinoculación	0	219 ± 14 a	6	10,7 ± 0,7a	12,3 ± 0,3a	51 ± 2a	Presente
6	4-12	15-38	329 ± 19 b	6	12,1 ± 0,8a	12,7 ± 0,6a	44 ± 2a	“
6	8-15	0-0,5	270 ± 26 ab	5	11,4 ± 0,7a	12,6 ± 0,4a	nd	“
6	11-19	1-9	293 ± 19 ab	6	11,3 ± 1,0a	13,1 ± 0,5a	nd	“
5	15-23	0-0,3	209 ± 20 a	5	10,4 ± 1,2a	12,7 ± 0,5a	nd	“

DPI = días postinoculación

Promedio ± error estándar

a, b = letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05)

nd = no determinado

### ***Efecto de A. platys Maracay sobre algunas variables de la hemostasia secundaria***

Los resultados de las variables de la hemostasia secundaria obtenidos aparecen en la Tabla XI. Los valores presentados en esta tabla para cada una de las variables, representan el promedio de los resultados obtenidos para los seis Beagles, durante el curso de la infección experimental.

#### ***Concentración de fibrinógeno***

Aumentó en los picos de bacteriemia, siendo solamente significativo este aumento en el primero de ellos, cuando se compara, tanto con el valor inicial como con el valor obtenido en el segundo periodo de recuperación de la bacteriemia.

#### ***Tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)***

Los tiempos de coagulación TP y TTPa aparentemente no fueron afectados por la infección con *A. platys*.

#### ***Factor XIII***

El FXIII estuvo presente en los perros durante todo el transcurso del periodo de infección observado, por lo que no pareciera que fuera afectado por esta rickettsia.

### ***Efecto de A. platys Maracay sobre algunas variables de la Fibrinólisis***

Los resultados de la fibrinólisis aparecen en la Tabla XII. Los valores presentados en esta tabla representan el promedio obtenido para todos los Beagles durante la infección experimental.

#### ***Determinación semicuantitativa del dímero D (producto de degradación de la fibrina)***

No se observaron niveles aumentados del dímero D durante el curso de la infección con *A. platys*, encontrándose dentro de los niveles normales para perros (menores a 450 ng/mL.)

#### ***Tiempo de lisis del coágulo de euglobulina***

Tampoco fueron evidenciadas diferencias en la lisis del coágulo de euglobulina, entre el valor obtenido en la preinoculación y aquellos obtenidos en la postinoculación. Todos los coágulos se mantuvieron firmes en las tres horas de observación.

### ***Efecto de A. platys Maracay sobre los niveles séricos de anticuerpos IgG asociados a plaquetas (IgGAP)***

La elevación del porcentaje de la fluorescencia corresponde al aumento de plaquetas recubiertas con IgG capaz de unirse a la superficie plaquetaria (IgGAP). En



**Tabla XII. Efecto de la inoculación experimental con *Anaplasma platys* Maracay sobre algunas variables de la fibrinólisis (dímero D y tiempo de lisis del coágulo de euglobulina) en Beagles de un año de edad**

<b>n</b>	<b>curso de la infección</b> (días)	<b>bacteriemia</b> (%)	<b>dímero D</b> (ng/mL)	<b>lisis del coágulo de euglobulina</b> (minutos)
6	preinoculación	0	< 200	> 180
6	4-12	15-38	“	“
6	8-15	0-0,5	“	“
6	11-19	1-9	“	“
5	15-23	0-0,3	“	“

la Tabla XIII se muestran los resultados del análisis de la detección de anticuerpos capaces de unirse a las plaquetas circulantes en los sueros de los Beagles infectados con *A. platys* de los seis animales evaluados, al ensayar los sueros obtenidos en las semanas dos y cuatro de la infección, con excepción del Beagle 2, al cual se le realizó el ensayo solo en la semana cuatro postinoculación.

Los resultados postinoculación evidenciaron una fuerte señal de fluorescencia en comparación con el correspondiente control negativo (preinoculación). La elevación del porcentaje de fluorescencia corresponde al aumento de plaquetas recubiertas con IgG capaz de unirse a la superficie plaquetaria. Por otro lado, el número de plaquetas en sangre estuvo en un valor normal (200.000-400.000/ $\mu$ L) para los perros 1,2 y 5, en cambio para el perro 6 el número de plaquetas fue de 15.000/ $\mu$ L. La bacteriemia de los cuatro animales mencionados, para cuando alcanzaron este incremento de IgGAP, fue de 0% para los perros 1 y 2, y de 0,6 y 2 % para los perros 5 y 6 respectivamente. Los perros 3 y 4, sin embargo, no mostraron este incremento en el porcentaje de IgGAP después de la inoculación.

En la segunda semana postinoculación, donde los animales alcanzaron un porcentaje alto de plaquetas infectadas, no se observó aumento de los niveles de IgGAP en los seis animales para los DPI estudiados. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos de los controles y en la Figura 19 se observan los resultados de la medición por citometría de flujo de los anticuerpos antiplaquetarios circulantes en el suero de tres de los animales infectados. Los niveles de IgGAP en los Beagles 1, 2, 5 y 6 aumentaron hasta seis veces, en comparación con su valor de preinoculación (día 0), este aumento ocurrió en la cuarta semana post-inoculación para los cuatro perros. En la figura 20 puede observarse que en el pico máximo de bacteriemia, como valor promedio de los seis animales, los niveles del valor promedio de IgGAP son bajos, posterior a la máxima parasitemia aparece el pico máximo de los valores promedio de IgGAP, en este momento ya la bacteriemia era baja.

**Tabla XIII. Efecto de la inoculación con *Anaplasma platys* Maracay sobre los niveles séricos de IgG asociada a plaqueta (IgGAP) (determinado por citometría de flujo) y sobre el recuento de plaquetas en seis Beagles de un año de edad**

<b>Beagles</b>	<b>curso (días)</b>	<b>bacteriemia (%)</b>	<b>plaquetas x 10<sup>3</sup>/μL</b>	<b>IgGAP (%)</b>
1	0	0	407	9
	13	7	125	4
	26	1	6	7
	30	0	180	50
2	0	0	378	16
	25	0	265	85
3	0	0	297	7
	12	40	125	1
	17	0	4	2
	28	1	1	1
4	0	0	235	5
	16	12	30	7
	28	10	190	12
5	0	0	333	10
	19	6	34	12
	26	0,6	360	4
	31	0,6	240	31
6	0	0	300	16
	12	0,5	227	16
	16	1	5	17
	28	2	15	90

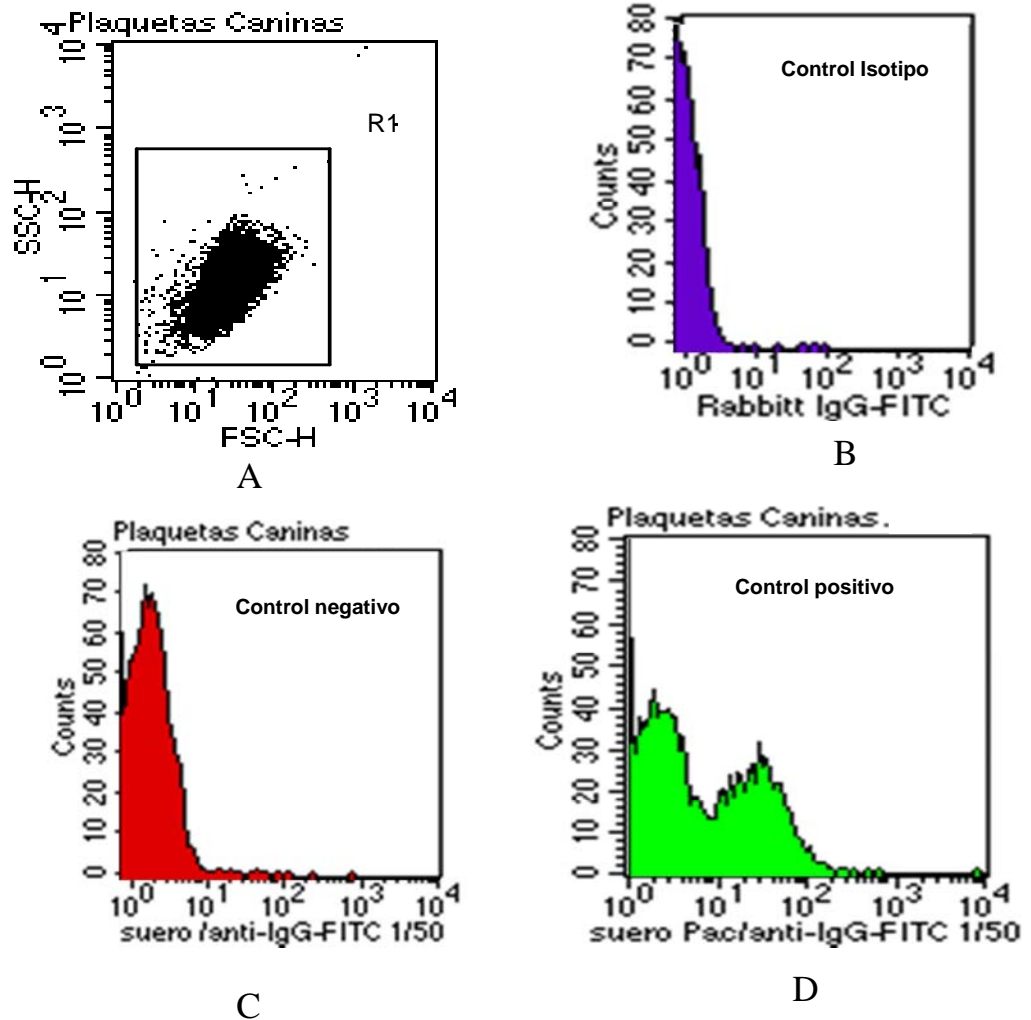
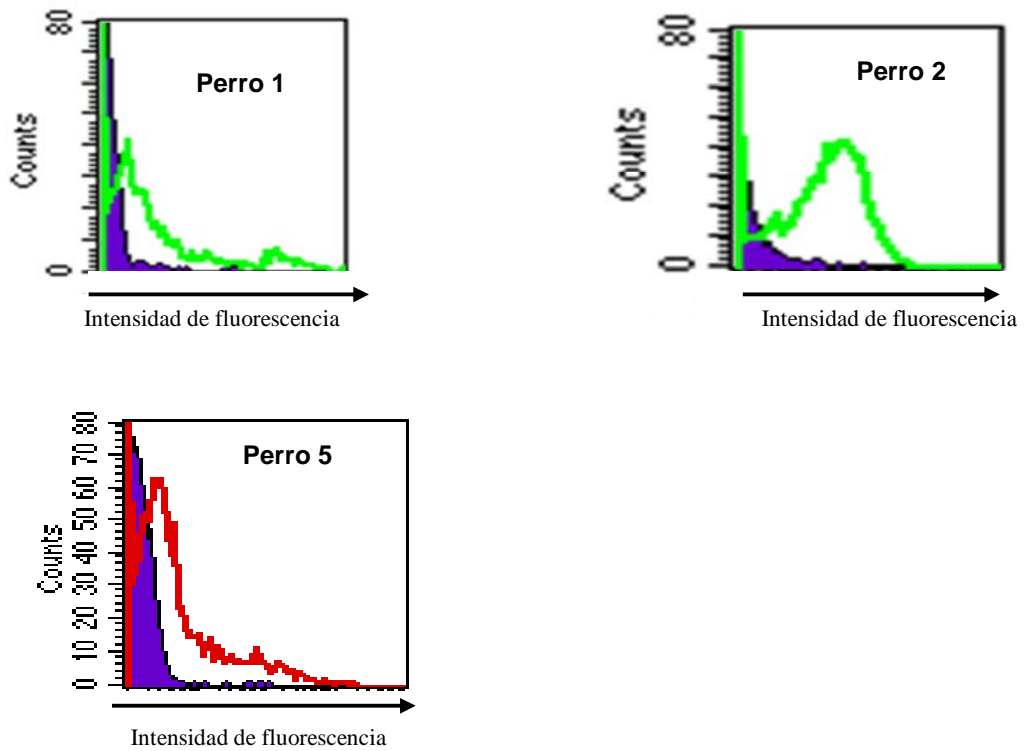
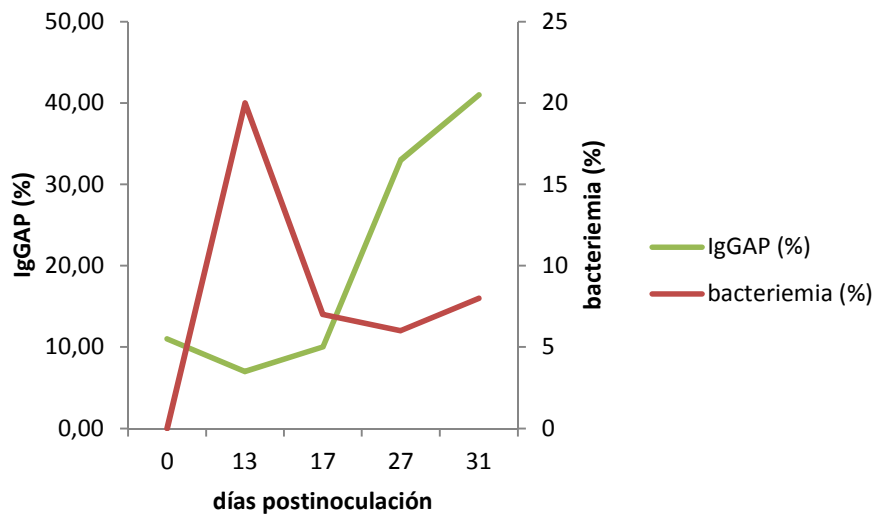


Figura 18. Histogramas de controles de sueros positivos y sueros negativos. A) dot plot de plaquetas de un perro sano. Se muestra la distribución del tamaño de plaquetas no teñidas, basada en las propiedades de la luz dispersada hacia delante (FSC-H, tamaño) y lateral o en ángulo recto (SSC-H, complejidad). La región 1 (R1) representa la ventana o región que define las plaquetas e histogramas de los controles. B) control isotipo muestra plaquetas incubadas con IgG de conejo conjugada con FITC. C) control negativo, plaquetas de un canino sano incubadas con suero de un canino sano y anti-IgG canina conjugada con FITC. D) control positivo (plaquetas de un canino sano incubadas con suero que contenía anticuerpos antiplaquetas, perteneciente a un canino con trombocitopenia)



**Figura 19. Histogramas de tres perros infectados experimentalmente con *A. platys* Maracay, con un alto porcentaje de plaquetas recubiertas con IgG (% de IgGAP). El histograma de fondo relleno indica el control isotipo.**



**Figura 20. Efecto de la inoculación con *Anaplasma platys* Maracay sobre el porcentaje de IgG asociada a plaqueta (IgGAP) (determinado por citometría de flujo) de seis Beagles de 1 año de edad**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### CAPÍTULO I

#### **Obtención del inóculo de *Anaplasma platys* Maracay a partir de perros infectados con esta rickettsia**

##### *Características del inóculo*

El inóculo consistió en una suspensión de un plasma rico en plaquetas (PRP) perteneciente a un canino que mostraba signos clínicos consistentes con infección adquirida naturalmente debida a *Anaplasma platys*. La observación bajo microscopio de luz de los FCB permitió evidenciar la presencia de inclusiones basofílicas en el interior de las plaquetas del inóculo, siendo las características morfológicas y de tinción de estas inclusiones fuertemente sugerentes de positividad a *A. platys*, además de ser este microorganismo el único conocido que infecta a las plaquetas de caninos.

El análisis de las inclusiones plaquetarias, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), reveló una morfología ultraestructural típica de un organismo rickettsial, similar a *A. platys*, como se deduce de las micrografías electrónicas tomadas a los organismos en el interior de las vacuolas, dentro de las plaquetas caninas (Figura 5). La presencia de doble membrana en estos cuerpos de inclusión residiendo en vacuolas es característica de un organismo rickettsial (84,120) como lo es *A. platys*, y por tanto es uno de los criterios clave para su identificación.

Las características morfológicas ultraestructurales de los microorganismos observados en el presente trabajo se asemejan a las reportadas por otros autores. Las formas (redondas, ovaladas y arriñonadas) (10, 14, 101, 130, 201), estando la forma de frijol (arriñonada) asociada al proceso de división del microorganismo (14, 130, 222). Aunque el tamaño de la mayoría de los microorganismos se encontró dentro del rango reportado (0,45 a 1,55  $\mu\text{m}$  de diámetro) (14) y (0,35 a 1,25  $\mu\text{m}$  de diámetro) (130), algunos llegaron a alcanzar el doble de tamaño (3,3  $\mu\text{m}$ ). Presencia de múltiples (9) organismos dentro de una vacuola, similar a otros autores (14). Existencia de una matriz

fibrilar en el centro de algunos cuerpos anaplasmales (14). Más de una vacuola dentro del citoplasma de una misma plaqueta, siendo el interior de estas vacuolas de aspecto claro. Todas estas características del microorganismo encontrado en el inóculo junto a la localización intraplaquetaria del mismo permiten identificarlo como *A. platys*.

Hasta la fecha, los estudios de la ultraestructura de las inclusiones observadas en el interior de las plaquetas de caninos han sido realizados en Venezuela por Arraga *et al.* (10, 14) en Maracaibo (Estado Zulia) y por Oviedo (222) en Maracay (Estado Aragua). Por tanto, el presente estudio correspondería al tercero existente en el país que aporta datos ultraestructurales de las inclusiones observadas en las plaquetas de caninos infectados con una cepa local de *A. platys*.

También pudo ser confirmada la presencia de *A. platys* en este inóculo por la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El inóculo preparado a partir del perro mestizo infectado experimentalmente con *A. platys* (99% de bacteriemia) fue positivo por PCR para este microorganismo, detectándose un producto de PCR esperado de aproximadamente 678 pares de bases (pb) de longitud. La prueba de PCR y la confirmación por el análisis de la secuencia de los productos amplificados (amplicones), se considera la prueba de diagnóstico más fiable para *A. platys* hasta la fecha (149), siendo utilizada por muchos investigadores.



## CAPÍTULO II

### Efecto de la inoculación de *A. platys* Maracay sobre la hemostasia en seis Beagles

#### FASE DE PREINOCULACIÓN

##### *Diagnóstico de A. platys y de E. canis en los seis Beagles antes de la inoculación*

Previo a la inoculación con *A. platys* Maracay los Beagles utilizados en el presente trabajo fueron diagnosticados como negativos a *A. platys*, ya que no se observaron inclusiones en el interior de sus plaquetas y tampoco fueron detectados anticuerpos anti *A. platys* en el suero de estos animales.

Así mismo, estos perros fueron diagnosticados como negativos a *E. canis*, ya que no fueron evidenciadas inclusiones intramonocíticas y/o intralinfocíticas en su sangre y también debido a la ausencia de anticuerpos anti *E. canis* en el suero de los animales.

Por este motivo, los resultados obtenidos en el análisis de las diferentes variables estudiadas, en la fase de preinoculación, pudieron ser utilizados como control para compararlos con los resultados obtenidos en la fase de postinoculación, durante el transcurso de la etapa aguda de esta infección, aproximadamente de un mes de duración.

En esta fase de preinoculación también pudo ser optimizada la técnica de PCR anidada, concluyéndose por los análisis efectuados, que la temperatura óptima para su realización era la de 60°C. También se evidenció la alta sensibilidad de esta técnica, ya que pudo detectar cantidades hasta de 0,78 ng de ADN y, a juzgar por el tamaño de la banda, pareciera que pudiera detectar cantidades menores a ésta. Por este motivo se tomó la decisión de utilizar la técnica de PCR anidada para los diagnósticos de *A. platys* y de *E. canis* de los Beagles durante la fase de postinoculación.

##### *Variables hematológicas, hemostáticas y de la fibrinólisis*

Los valores de hematocrito, hemoglobina, CHCM y recuento de leucocitos en los Beagles obtenidos antes de la inoculación (Tabla IX) se encontraron dentro del rango reportado como normal para esta especie (Tabla I). En cuanto a la morfología de estas células, pudo observarse que previo a la inoculación con el microorganismo anaplasma, se correspondía con las características señaladas para su especie (258). También el recuento de plaquetas (Tabla X) se encontró dentro del rango normal para esta especie.

Se decidió realizar la agregación plaquetaria en sangre total, ya que, debido a los altos hematocritos de los Beagles, se dificultaba obtener suficiente cantidad de PRP libre de eritrocitos; además previendo que la trombocitopenia característica de la infección con *A. platys* dificultara la obtención del PRP y la medición de la agregación plaquetaria.

Se realizaron ensayos de agregación plaquetaria en sangre total, utilizando como inductores al ADP (25 y 50  $\mu$ M), y al ácido araquidónico (AA) (0,5 y 1 mM), no observándose respuesta consistente con ninguno de ellos en los animales. Aparentemente el uso de ADP como agente agregante por el método electrónico en sangre completa de perros es de valor limitado (146), posiblemente debido a un menor contacto plaqueta-plaqueta en presencia de eritrocitos. En perros se ha observado en PRP una respuesta de las plaquetas al AA altamente variable, no responden, agregan reversiblemente o irreversiblemente. Jütner *et al.* (156) tampoco observaron agregación con AA en ninguno de los 24 perros pastor alemán evaluados.

Los desalentadores resultados obtenidos con estos agregantes, llevaron a realizar la agregación plaquetaria utilizando colágeno como agente agregante, el cual dió respuestas consistentes en los animales. Los valores de agregación con colágeno y de secreción con colágeno y con trombina, en sangre total, antes de la inoculación con *A. platys* (Tabla X) se encuentran dentro de lo reportado en perros sanos (Tabla I).

En cuanto al Factor Von Willebrand, los resultados preinoculación obtenidos en los perros del presente estudio tuvieron un valor promedio de 51% (Tabla XI), el cual se encuentra comprendido dentro del límite de lo normal en perros, reportado por Brooks (41) (Tabla I), siendo considerados por este autor como indefinidos, con muy bajo riesgo de expresar la enfermedad de Von Willebrand, teniendo los perfiles hemostáticos secundarios normales (218). Este hecho fue un hallazgo accidental, ya que los Beagles nunca presentaron sintomatología de EvW, además no son una de las razas reportadas con alta prevalencia de esta enfermedad (43, 111, 291).

La ausencia de hemorragias superficiales (petequias, epistaxis), inclusive cuando, por motivo de la infección con *A. platys*, presentaron trombocitopenias severas, apoya el bajo riesgo de expresar la enfermedad de von Willebrand en los Beagles del presente estudio. Lo anterior está de acuerdo con el TTPa obtenido (Tabla XI), que estuvo dentro

del rango normal para esta especie (Tabla I). En todo caso, se sabe que el contenido de FvW en el endotelio es normal en perros con enfermedad de von Willebrand (205, 206) pudiéndose, por tanto, utilizar animales con esta enfermedad para evidenciar daño endotelial, que era la finalidad de la valoración de esta prueba.

El valor medio basal (preinoculación) del TP (Tabla XI) estuvo ligeramente alargado (10,7 s), según el rango de valores de referencia (Tabla I). Al analizar los valores individualmente (crudos) se puede observar que los Beagles 2 y 5, los cuales eran hermanos entre sí, tienen valores normales de TP (7,5 a 8,9 s), mientras que los Beagles 1, 3, 4 y 6 hermanos entre sí, pero de padres diferentes a los anteriores, fueron los que presentaron valores ligeramente alargados del TP (11,7 a 12,9 s).

Debido a que el TTPa de los animales se encontró dentro de los valores de referencia para los perros, podría pensarse en una ligera deficiencia del Factor VII, ya que no se han reportado en animales deficiencias del factor tisular (114). Recientemente ha sido identificada la mutación autosómica recesiva causante de la deficiencia de FVII en los Beagles (47). Los animales heterocigotos para esta mutación tienen una coagulación normal y no presentan riesgo de hemorragia (fenotipo asintomático).

A los cuatro Beagles afectados del presente trabajo no les fue realizada la prueba que detecta esta mutación, pero el hecho de que no hayan presentado hemorragias, inclusive en los episodios trombocitopénicos, sumado a sus valores de TP, que, aunque alargados (11,7 a 12,9 s) estuvieron por debajo del rango reportado (13 a 18 s) en perros Beagles deficientes en FVII con fenotipo asintomático (47), hace especular que la deficiencia del FVII en los cuatro Beagles fue leve.

Por otra parte los niveles del factor I (fibrinógeno) de los perros antes de la inoculación (Tabla XI) también se encontraron dentro de los valores de referencia (Tabla I). Además, fue observada presencia del FXIII en los Beagles del presente estudio antes de la inoculación, lo cual coincide con la literatura consultada, en donde hasta la fecha no se ha reportado deficiencia de FXIII en animales (90). El FXIII fue medido cualitativamente por la prueba de solubilidad en urea. Aunque la sensibilidad de esta prueba es escasa para detectar deficiencia de Factor XIII, sin embargo fue de utilidad para el presente trabajo, ya que permite detectar a aquellos pacientes con riesgo de desarrollar complicaciones hemorrágicas. Por lo anterior, se puede concluir que los

Beagles utilizados en el presente trabajo no tenían riesgo de desarrollar complicaciones hemorrágicas. En cuanto al sistema fibrinolítico, pudo ser observado que los niveles plasmáticos de dímero-D de fibrina en las muestras de los perros preinoculación (menores de 200 ng/mL) (Tabla XII) se encuentran dentro del rango reportado como normal para perros sanos (Tabla I). Además el tiempo de lisis del coágulo de euglobulina (TLE) (Tabla XII) se mantuvo por más de tres horas (periodo de observación), antes de la inoculación con *A. platys*, encontrándose comprendido dentro de los valores de referencia para perros (Tabla I).

## FASE DE POSTINOCULACIÓN

### *Diagnóstico de Anaplasma platys en los Beagles estudiados*

La identificación de *A. platys* en los Beagles infectados experimentalmente, mediante los FCB por microscopía de luz, se basó en la observación de la aparición, entre los 5 y 14 días postinfección, de las inclusiones basofílicas intraplaquetarias típicas de la trombocitopenia cíclica infecciosa canina. Por otra parte, no se evidenciaron inclusiones intracitoplasmáticas en ninguno de los diferentes tipos de leucocitos examinados durante todo el ensayo.

El estudio de la reactividad serológica frente a *A. platys*, por medio de la técnica de IFI, reveló un título de anticuerpos a estas rickettsias mayor a 1:160 (resultado positivo) en cinco de los perros (83,3%) infectados experimentalmente con *A. platys*, en la cuarta semana postinoculación (fecha del muestreo para IFI). El que uno de los perros no resultara positivo para esta prueba de IFI, posiblemente se deba a que para el día de la toma de la muestra, este animal no había logrado alcanzar el título de anticuerpos necesario para considerar a la prueba positiva (> 1:160). Los anticuerpos anti *A. platys* se pueden empezar a detectar en el día 7 postinfección (PI) en perros inoculados experimentalmente, según Baker *et al.* (18) y entre los 13-19 días PI según French y Harvey (96), permaneciendo elevados hasta por dos meses (10).

La infección de los Beagles se debió exclusivamente a *A. platys*, ya que ninguno de los perros presentó anticuerpos en suero a *E. canis* detectados por IFI, previo a la inoculación, ni los desarrolló en la cuarta semana post inoculación, fecha en que se

realizó el muestreo, tiempo suficiente para haberse producido títulos de IgG para *E. canis* (295). Tampoco hay duda de que los anticuerpos anti *A. platys* producidos en los Beagles no sean anticuerpos anti-*E. canis*, ya que hasta ahora no ha sido demostrada la reactividad cruzada entre *E. canis* y *A. platys* (96). Por otra parte, aunque existe reactividad cruzada entre *A. phagocytophilum* y *A. platys* (149), y ambas causan infecciones en el perro, no se puede pensar en la existencia de reacciones cruzadas entre estas dos especies de anaplasma en el presente trabajo, ya que no fueron observadas inclusiones dentro del citoplasma de los neutrófilos de los animales que permitiera sospechar de una infección con *A. phagocytophilum*. Además, antes de la inoculación, los perros no presentaron anticuerpos anti-*A. platys* y, como ya se demostró anteriormente, el inóculo solo tenía plaquetas con *A. platys*.

Todos los perros resultaron positivos a *A. platys* por la técnica molecular de PCR anidada optimizada por Martin *et al.* (198), obteniéndose una banda bien definida de un producto de PCR de aproximadamente 678 pb, amplificado a partir del ADN derivado del organismo rickettsial intraplaquetario, similar a la reportada por estos autores para este microorganismo. En la actualidad la identificación del ADN de *A. platys* dentro de las muestras de sangre provee la mejor oportunidad para dar un diagnóstico directo y definitivo de trombocitopenia cíclica infecciosa canina.

En este estudio se utilizó un PCR anidado para amplificar una porción del gen ARNr 16S de *A. platys*, el cual es más sensible y específico que el PCR estándar de un solo paso, y permite detectar casos de infección con menos de 1% de plaquetas infectadas (198), disminuyendo, por tanto, la probabilidad de reportar resultados falsos negativos.

A nivel molecular es poco lo que se conoce de la bacteria intracelular obligada *A. platys*, por lo que el presente estudio representa una contribución importante a la caracterización molecular de las cepas que están propagadas en Venezuela. Este trabajo es el tercero que caracteriza genéticamente al microorganismo en Venezuela, pero tiene la ventaja de ser el primero realizado en el país en una infección experimental por *A. platys*, es decir una infección controlada, sin coinfecciones con otros agentes patógenos, caracterizándose genéticamente al organismo aislado de la sangre de los perros de investigación.

Al comparar la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *A. platys* Maracay con la secuencia de las cepas venezolanas de Maracaibo, *A. platys Venezuela*, (AF156784) y de Lara, *A. platys Lara* (AF399917), se observó que difirió en un solo nucleótido con respecto a ellas, en posición 115 y 144, respectivamente (Tabla VII), diferencia suficiente para clasificarlo como una nueva cepa venezolana de este anaplasma.

Algunas secuencias reportadas en el GenBank pertenecientes a diferentes cepas de *A. platys* difieren también en un solo nucleótido, como es el caso de las Cepas Florida y Oklahoma, de EUA (201) y de la cepa Sommières en Francia (21). Según Mathew *et al.* (201) variaciones mínimas entre las cepas aisladas de *A. platys* son posibles, no debiendo sorprender este hecho, a juzgar por los resultados obtenidos a nivel mundial. Todo lo anterior sugiere la presencia de al menos tres cepas de *A. platys* propagadas en Venezuela.

Así mismo, el análisis de la relación filogenética mostró que la cepa *A. platys* Maracay está estrechamente relacionada a otras cepas descritas en el mundo: EUA (M82801), Japón (AF536828, AY077619), Francia (AF303467) y China (AF156784), como se muestra en el árbol filogenético presentado en la Figura 12. Estos resultados apoyan la propuesta de Huang *et al.* (138) sobre la poca diversidad genética entre las cepas de *A. platys*, basada en la cercana similitud entre sus secuencias de ADNr 16S en todas estas regiones del mundo, lo cual es consistente con reportes previos (4, 75, 321), sugiriendo una evolución lenta y homogénea de este microorganismo.

La baja diversidad entre cepas también ha sido observada en otras rickettsias, como en *Ehrlichia chaffensiis* (201). Es importante resaltar que la secuenciación del ADNr 16S constituye un método eficaz y rápido de identificación bacteriana, habiéndose realizado en el presente trabajo la secuenciación de las dos cadenas de ADN (delantera y reversa) por duplicado, en Corea y en el IVIC.

#### ***Patogenia de la infección experimental con A. platys***

El periodo de incubación (prepatente), comprendido desde la inoculación hasta la aparición de las plaquetas infectadas por *A. platys*, varió de 5 a 14 días, alcanzando un pico de bacteriemia 2 a 3 días después de la bacteriemia inicial. Esto es similar a lo reportado por Harvey *et al.* (130), quienes observaron un periodo prepatente de 6-12 días y bacteriemias máximas 4 días después de la aparición de los anaplasmas.

La ausencia de hemorragias petequiales o equimosis en los perros del presente estudio coincide con lo citado por Baker *et al.* (18) y Harvey *et al.* (130). Se ha sugerido que las hemorragias no se presentan posiblemente por la poca duración de las trombocitopenias en esta enfermedad, usualmente de 2 a 3 días (130), siendo este lapso de 1 a 5 días en el presente estudio.

La falta de hemorragias también puede ser explicada por la presencia de macroplaquetas, las cuales pudieron ser observadas al analizar los extendidos sanguíneos. Es sabido que las macroplaquetas tienen mayor capacidad funcional (161) y, por tanto, mayor efectividad hemostática para fortalecer al endotelio de los capilares y en consecuencia para prevenir las hemorragias petequiales y purpúreas que caracterizan al estado trombocitopénico y que pueden aparecer en piel y en membranas mucosas.

Tanto en la primera infección experimental, realizada en la primera etapa de este estudio en tres perros mestizos, como en la ocasionada en la segunda etapa, a los seis Beagles del presente trabajo, se presentaron como únicos signos clínicos temperaturas rectales moderadamente elevadas (39,1- 39,9 °C), depresión e inapetencia en los picos de infección, en especial en el primer pico. La falta de severidad de la patogenia, observada coincide con lo reportado por diferentes autores (18, 130, 134, 298). Incluso otros investigadores han reportado ausencia de enfermedad clínica durante la infección experimental (103). También coincide con el único trabajo que reporta signos clínicos en Venezuela sobre infección experimental (signos leves) y natural (ausencia de signos) de *A. platys* en perros, con porcentajes importantes de plaquetas infectadas (14).

En cambio, la poca patogenicidad observada en el presente trabajo está en contraposición con lo reportado en Grecia (168), Israel (128) y España (4) sobre casos clínicos graves de infección natural por *A. platys* en perros. Al parecer esta cepa de la región mediterránea es más patógena que las reportadas en otras regiones, provocando fiebre de hasta 40,2 °C, anorexia, pérdida de peso, abatimiento, palidez y petequias en mucosas, lesiones hemorrágicas cutáneas y descarga nasal mucoporulenta. Debido a estos reportes es posible que exista una variación en la virulencia entre cepas de *A. platys*. Recientemente Abarca *et al.* (1) en Chile, también han reportado síntomas más severos en perros con infección natural por este anaplasma. Según los resultados del presente estudio en Beagles, la cepa de *A. platys* Maracay es poco patógena. Las

escasas y moderadas manifestaciones clínicas fueron observadas en la fase aguda de la infección, monitoreada durante 35 días. La poca severidad de los síntomas puede también ser atribuida a que se trató de una infección experimental controlada, sin coinfecciones con otros patógenos, como *E. canis*, que ayudarían a acelerar la severidad de los síntomas, siendo ya descrita en la literatura la potenciación de la patogenicidad por la infección con estos dos microorganismos, contribuyendo a algunas de las manifestaciones atípicas que han sido histórica y clínicamente atribuidas a infecciones por un solo patógeno (103).

Por otra parte, se conoce que bajo condiciones naturales la transmisión por garrapatas influye potencialmente en el hecho de que un microorganismo cause infección clínica o bien infección subclínica. Algunos de esos factores pueden afectar a la respuesta inmunitaria contra los organismos, o la patogenicidad de una cepa concreta del mismo, siendo ésto una limitación de los estudios de infección experimental, como es el caso actual.

Los Beagles del presente estudio fueron tratados al final del periodo de observación (finalizando la fase aguda de la enfermedad) con doxiciclina (10mg/Kg de peso corporal, cada 24 horas, durante 21 días), por lo que la fase de convalecencia y la fase crónica (estado de portador) de la enfermedad no fueron evaluadas.

#### ***Efecto de la infección experimental con A. platys sobre la hematología***

La anemia normocítica, normocrómica observada en los tres picos de bacteriemia en todos los perros (Tabla IX) coincide con lo reportado por Baker *et al.* (19), en 10 perros adultos, a los 7 días de haber sido infectados experimentalmente con *A. platys*. Una posible causa de esta anemia es la alteración del metabolismo del hierro, donde, como resultado de la reacción inflamatoria, el hierro se desvía hacia los tejidos inflamados y disminuye su disponibilidad para la síntesis de hemoglobina. Esto ya ha sido demostrado por estos mismos autores, quienes evidenciaron disminución de la concentración del hierro sérico y de la capacidad de unir hierro, lo cual unido a la disminución del hematocrito fue compatible con el síndrome denominado por Cartwright *et al.* (52) como anemia de la infección.

Otra posible causa de la anemia que presentaron los beagles sería la eritrofagocitosis por monocitos, observada en el presente estudio en los frotis sanguíneos



teñidos de todos los Beagles, lo que coincide con reportes previos en perros inoculados con *A. platys*, observando eritrofagocitosis a los 14 días post infección (18). También pudo haber contribuido a la anemia observada la posible presencia de hemorragias en órganos internos. Aunque en el presente trabajo no se sacrificaron los animales, por lo que no pudo ser evaluada la presencia de hemorragias en sus órganos internos, otros autores han reportado hemorragias esplénicas en esta infección (18).

Durante los periodos de recuperación, con muy bajas bacteriemias, que ocurrían entre los 3 y 5 días después de cada pico de infección, pudo ser observado en los Beagles (Tabla IX) que, tanto el hematocrito, como la concentración de hemoglobina, aumentaban a valores normales en muy poco tiempo, es decir que la médula ósea de los animales conservó su capacidad para producir eritrocitos y éstos, a su vez, la de sintetizar hemoglobina.

La disminución no significativa del recuento total de leucocitos, en los periodos de bacteriemia, no alcanzó valores de leucopenia, y no fue específica para ningún tipo particular de leucocitos. Este resultado coincide con lo reportado por Harvey *et al.* (130) quienes llegaron a observar descensos incluso mayores de leucocitos (30 a 50%) en perros mestizos infectados experimentalmente con *A. platys*, al comparar con los controles, siendo esta disminución semejante para todos los tipos de glóbulos blancos en general. La disminución de leucocitos en infección por *A. platys* puede incluso llegar a ser leucopénica, según lo observado por Baker *et al.* (19), lo que coincide con lo reportado por Schalm *et al.* (258) sobre la existencia de leucopenia en infecciones bacterianas agudas.

Las alteraciones morfológicas observadas en los diferentes leucocitos después de la inoculación con *A. platys*, especialmente en los picos de bacteriemia, indican activación de las células del sistema inmunitario innato (monocitos y neutrófilos) como respuesta a la infección. Estas alteraciones han sido también descritas por Arraga (13) para perros afectados por *A. platys*.

La presencia de células reticuladas de color rosado (eosinofílicas), algunas veces con glóbulos rojos y plaquetas atrapados en ellas, observadas en todos los FCB de los seis perros, después de la inoculación, no ha sido reportada hasta la fecha en estas infecciones, desconociéndose su significación clínica. En pacientes con

reticuloendoteliosis leucémica o leucemia de células velludas, han podido ser observadas en sangre células reticuladas fagocíticas con proyecciones citoplasmáticas, rodeadas de un anillo de leucocitos (282).

***Efecto de la infección experimental con A. platys sobre la hemostasia primaria y sobre los niveles séricos de anticuerpos antiplaquetas***

La trombocitopenia y bacteriemia (Tabla X) coincidentes y cíclicas (trombocitopenia cíclica infecciosa canina) observadas después de la inoculación con *A. platys* Maracay, se asemejan a las reportadas por numerosos autores (10, 14, 36, 96, 128, 130, 201). Hasta la fecha se desconoce la causa de esta trombocitopenia, aunque se especula que se deba en parte al daño directo a la plaqueta infringido por la replicación de la bacteria (130). Esta replicación de *A. platys* en la plaqueta es corroborada con las observaciones realizadas en el presente trabajo mediante MET, evidenciándose organismos anaplasmales en forma arriñonada (fase de división) con vacuolas iniciales con un solo organismo y plaquetas con vacuolas conteniendo hasta nueve microorganismos (mórula), ocupando casi la totalidad del citoplasma de la plaqueta.

El daño directo a la plaqueta infectada, presentado intravascularmente, ocasionaría un acortamiento de la sobrevivencia plaquetaria, produciendo trombocitopenia no inmunitaria. Este mecanismo de destrucción periférica de las plaquetas infectadas directamente por *A. platys* pareciera ser el más aceptado como causa de los episodios de trombocitopenia que coinciden con episodios bacteriémicos.

Se hizo necesario realizar el recuento de las plaquetas de forma manual, mediante la observación de las plaquetas en la cámara de Neubauer, por ser el recomendado en perros trombocitopénicos con macroplaquetas, ya que los recuentos muy bajos de plaquetas, observados en el presente ensayo, en algunas etapas de la infección por *A. platys*, hubieran estado fuera del límite de sensibilidad del contador electrónico.

Además, el recuento manual evitó que las macroplaquetas fueran contadas como eritrocitos por este instrumento, lo que hubiera sobreestimado el grado de trombocitopenia. Por este motivo no pudo ser medido el volumen medio de las plaquetas (VMP), el cual se requiere para el cálculo de la masa plaquetaria (recuento plaquetario x VPM), siendo considerado mejor parámetro que el recuento plaquetario para evaluar trombocitopenias (30, 128). Harrus *et al.* (128) reporta un valor de VPM de

13,6  $\mu^3$  en un perro infectado naturalmente con *A. platys*, el cual es mayor en comparación al rango de referencia para esta especie (Tabla I).

En el presente trabajo fue realizada la observación del tamaño de las plaquetas visualizando a los extendidos sanguíneos por medio del microscopio óptico. El aumento presentado del porcentaje de macroplaquetas (5 a 30%) (incremento en el VPM) concomitante a la presencia de trombocitopenia severa ( $<10.000/\mu\text{L}$ ), así como de microplaquetas, observado inmediatamente después de los picos de bacteriemia en el presente trabajo, reflejan trombopoyesis activa (305). Ha sido observado anteriormente en perros con trombocitopenia autoinmunitaria (163, 221), presencia de microtrombocitosis y macrotrombocitosis. Además, diferentes autores han evidenciado en perros, con este tipo de trombocitopenia, macroplaquetas asociadas con un aumento de megacariocitos en la médula ósea (169, 29). Así mismo, Gaunt *et al.* (101) reportaron aumento de megacariocitos en médula ósea durante la infección por *A. platys*. A la luz de estos resultados, era posible esperar que una causa inmunitaria para la trombocitopenia jugara un papel importante en la infección por *A. platys*.

Esta relación entre trombocitopenia y un mecanismo inmunitario pudo ser corroborada en la infección por *A. platys* en el presente trabajo, mediante el hallazgo de anticuerpos antiplaquetas en el 67% de los perros estudiados (Beagles 1, 2, 5 y 6), a finales de la cuarta semana postinoculación (Tabla XIII), coincidiendo con el segundo periodo de recuperación. En los perros 1, 2, 5 y 6 disminuyó el recuento de plaquetas en un 44%, 70%, 72% y 95% respectivamente con respecto a su valor preinoculación. Los tres primeros perros no manifestaron bacteriemia en este periodo, por lo tanto, la disminución del número de plaquetas pudo originarse por la fagocitosis y/o a lisis mediada por complemento de las plaquetas recubiertas con IgG. El hallazgo de la presencia de anticuerpos antiplaquetas en la trombocitopenia cíclica infecciosa canina representa uno de los principales aportes del presente estudio, ya que es la primera vez que se reportan IgGAP en la infección producida por *A. platys*.

Bexfield *et al.* (26) han reportado en perros presencia de anticuerpos antiplaquetas en infecciones por *A. phagocytophilum*. También han sido observados estos anticuerpos en infecciones con otras rickettsias, como en la fase aguda de la ehrlichiosis canina experimental, en perros Beagles (305, 306) y en infecciones naturales y experimentales

de *Rickettsia rickettsii* (119) y de *A. phagocytophilum* (26), así como en caninos infectados por protozoarios como *Babesia gibsoni* (312) y *Leishmania infantum* (290, 66).

La falta de incremento de anticuerpos antiplaquetas observada durante la cuarta semana de infección con *A. platys* en los perros 3 y 4 (Tabla XIII), pudiera explicarse por la presencia de inmunoglobulinas séricas de alta avidéz, las cuales se unirían con mayor fuerza a la plaqueta, trayendo como resultado títulos séricos de IgGAP bajos a normales. Lo anterior ha sido sugerido por Kristensen *et al.* (170), quienes tampoco pudieron observar anticuerpos antiplaquetas en el 100% de los perros con trombocitopenia mediada inmunitariamente, por lo que en estos casos es recomendable una prueba directa que detecte los anticuerpos antiplaquetas en la superficie plaquetaria (183, 312).

En el primer episodio de infección, cuando la trombocitopenia fue severa, no pudo observarse presencia de anticuerpos antiplaquetas, por lo que no pareciera el mecanismo inmunológico la causa de la disminución del recuento plaquetario en este primer pico de bacteriemia, pudiendo ser la destrucción mecánica por la bacteria el mecanismo implicado. Lo anterior coincide con la hipótesis sugerida por Harvey *et al.* (130), en cuanto a que las trombocitopenias al inicio de la infección, con altas bacteriemias por *A. platys* (31-63%), podrían desarrollarse como consecuencia de la lesión directa a las plaquetas por la replicación de los organismos rickettsiales, mientras que otros mecanismos, como aquellos propuestos para la inducción de reacciones autoinmunitarias que llevan a la destrucción de las plaquetas, pueden ser importantes en los episodios con bacteriemias bajas (1-13%) pero con trombocitopenias tan severas como las observadas al inicio.

Los perros del presente estudio con TCIC aguda desarrollaron anticuerpos antiplaquetas entre los 25 a 30 DPI. Como ya se dijo, no existen reportes sobre detección de anticuerpos antiplaquetas en infecciones con *A. platys*. En perros infectados con *E. canis* la aparición de anticuerpos antiplaquetas fue mas temprana, a los 17 DPI (305), a los 14 DPI (102), entre los 7 y 14 DPI (119), y entre los 3 y 10 DPI (306). Otros factores como complejos inmunitarios circulantes deberían ser investigados. Son necesarios más estudios para determinar los antígenos plaquetarios diana para los

anticuerpos encontrados en estos perros con TCIC, y para evaluar el efecto patogénico de estos anticuerpos.

En conclusión, aparentemente mecanismos inmunitarios y no-inmunitarios parecen estar implicados en la destrucción de las plaquetas durante la trombocitopenia cíclica infecciosa canina.

Por otro lado, al analizar los resultados crudos, en cinco de los Beagles estudiados (83%), pudo observarse trombocitopenia con duración de 1 a 3 días en los periodos sin bacteriemia. Es lógico suponer que la duración de esta trombocitopenia coincidiría con el tiempo requerido por la médula ósea para reponer las plaquetas destruidas durante los picos de bacteriemia.

El mecanismo de supresión de la producción plaquetaria en la médula ósea no es válido para explicar el bajo número de plaquetas circulantes en los picos de bacteriemia en la infección por *A. platys* en el presente trabajo. La observación de notables incrementos en el porcentaje de macroplaquetas durante la fase aguda de la infección, principalmente durante la bacteriemia mas alta (primer pico), donde las trombocitopenias fueron mas pronunciadas, fue indicativo de buen funcionamiento de la médula ósea. El porcentaje de macroplaquetas obtenido (5 a 30%) fue hasta 15 veces superior a los valores establecidos, de 0,8 a 1,2 % por Pierce *et al.* (232) y de 1,45 - 1,94 % por Mylonakis *et al.* (214), para perros clínicamente sanos, obtenidos también por análisis de microscopía de luz de los frotis sanguíneos teñidos.

El presente estudio constituye el primer reporte de porcentaje de macroplaquetas en infección con *A. platys*. Harrus *et al* (128) también observaron plaquetas gigantes en la sangre de todos los perros (5) infectados naturalmente con *A. platys*, pero no reportó porcentaje de estas células. El incremento en el porcentaje de macroplaquetas observado en el presente trabajo fue semejante al observado en la fase aguda de la ehrlichiosis monocítica canina (213, 232).

Como se mencionó anteriormente el hallazgo de incrementos importantes de macroplaquetas indica trombopoyesis aumentada, secundaria a destrucción plaquetaria, como se ha evidenciado en trombocitopenia autoinmune (221). También existen estudios en humanos que indican una excelente correlación entre el número de megacariocitos de la médula ósea y el porcentaje de macroplaquetas en sangre periférica, en la mayoría de

las condiciones clínicas, con recuento de plaquetas normal o disminuido (100). Bajo esta consideración se podría especular que la presencia de estas plaquetas grandes en un número incrementado y la rápida recuperación del recuento plaquetario después de las bacteriemias, asociado con un aumento de la trombopoyesis, indicaría un recambio aumentado de las plaquetas en esta infección por *A. platys*, tal como ha sido sugerido por Harvey *et al.* (130).

Lo anterior coincide con los reportes de Baker *et al.* (18), quienes observaron hiperplasia megacariocítica de la médula ósea en diez perros Beagles y Mongrel a los 28 días postinfección experimental con *A. platys*. Además, se ha visto que el número promedio de megacariocitos de 10 muestras intactas de médula ósea por perro, en 10 Beagles y mestizos infectados experimentalmente con *A. platys*, fue significativamente mayor (10,0) que el número promedio obtenido (5,4) en perros no infectados (101).

Hasta la fecha no han podido ser observadas inclusiones rickettsiales dentro de los megacariocitos de la médula ósea, examinados por microscopía de luz, ni por otra técnica diagnóstica, aunque ha sido detectado ADN de *A. platys* en la médula ósea (85). Tampoco se han reportado cambios cíclicos en el número de los megacariocitos en los perros infectados. Este hecho, junto con los resultados del presente trabajo, en cuanto a incremento importante del porcentaje de macroplaquetas, permite descartar la existencia de una trombocitopenia de origen central en la infección por *A. platys* (218).

La ausencia de hemorragias superficiales en los Beagles del presente estudio, a pesar de sufrir trombocitopenias tan severas (hasta 1.000 plaquetas/ $\mu$ L), podría deberse por el aumento importante de macroplaquetas obtenido, las cuales pueden tener función normal a incrementada (44, 88, 161). Otros casos de macrotrombocitopenias sin sangramiento ocurren en la raza de perros Cavalier King Charles Spaniels (229), los que presentan una masa plaquetaria normal, a pesar de que el número de plaquetas esté disminuido, cuando se compara con el rango de referencia para otras razas de perro. Existe evidencia que soporta que es más importante mantener la masa plaquetaria, que el número de plaquetas, para la resolución de la trombocitopenia (128), desafortunadamente, el VPM no pudo ser medido en los perros del presente trabajo.

Analizando los resultados crudos del presente ensayo, pudo observarse en los periodos de recuperación, después del segundo pico de bacteriemia (20 a 28 DPI), en el

66% de los perros estudiados, un incremento temporal (1 a 3 días) del recuento plaquetario (datos no mostrados). Este incremento estuvo por encima del valor de referencia (trombocitosis) en el 33% de los casos (Beagles 2 y 5). En el otro 33% (Beagles 1 y 4), aunque el aumento del recuento plaquetario fue de dos veces su valor preinoculación, no llegó a sobrepasar el valor de referencia.

Estas trombocitosis suelen ser reactivas (88), siendo un indicador de inflamación, similar a los reactantes de fase aguda, como el fibrinógeno y la  $\alpha$  y  $\beta$ -globulina y están asociadas a infecciones agudas (64). El presente trabajo es el primero en reportar trombocitosis en la fase de recuperación de la infección por *A. platys*. Se han observado trombocitosis en cabras infectadas experimentalmente con *Ehrlichia spp* (230), en conejos infectados con *Pasteurella multocida* (250), y en humanos con infecciones bacterianas (5, 92, 180) como una respuesta consistente a la infección.

La rápida respuesta del sistema hematopoyético para restablecer el número de plaquetas a valores normales, observada en los dos períodos de recuperación de la infección con *A. platys* en el presente trabajo, significa que la médula ósea y los megacariocitos de los perros infectados son funcionales y pueden compensar en un corto periodo de tiempo la pérdida grave de plaquetas de la circulación periférica.

Al analizar los valores promedio de los resultados de agregación plaquetaria (Tabla X), se pudo observar que la disminución de la agregación en respuesta al colágeno, en los dos picos de infección, se correspondió con un bajo recuento de plaquetas que presentaron los animales en este periodo. Del mismo modo, en los periodos de recuperación (plaquetas infectadas < 0,6%), cuando el número de plaquetas alcanzaron valores cercanos a los de preinoculación, la respuesta al colágeno fue normal. Esta relación lineal entre el número de plaquetas y la agregación plaquetaria inducida por el colágeno coincide con lo descrito por varios autores (146, 156, 283). También reflejarían estos resultados una recuperación de la función plaquetaria después de los picos de infección, debido a síntesis de nuevas plaquetas funcionales por la médula ósea.

La disminución de la respuesta de agregación plaquetaria inducida por colágeno, por efecto de *A. platys* en el presente trabajo, coincide con lo observado por Gaunt *et al.* (101) en el único trabajo que reporta agregación plaquetaria en perros infectados con *A. platys* (4% de plaquetas infectadas), en este caso la infección también fue experimental.

La disminución en la agregación observada por estos autores solo ocurrió cuando utilizaron ADP (5  $\mu$ M) (101), en cambio no lograron observar disminución cuando utilizaron como inductor al colágeno a baja concentración (0,05 $\mu$ g/mL).

Por otra parte, cuando se analizan los resultados del presente trabajo individualmente (crudos) puede verse que solo el 42% de los valores bajos de agregación plaquetaria (0 a 2  $\Omega$ ) corresponden a recuentos muy bajos de plaquetas (30.000 a 125.000/ $\mu$ L), mientras que el 58% de los valores bajos de agregación plaquetaria (2 a 9  $\Omega$ ) corresponden a un recuento de plaquetas cercano a los valores normales (200.000 a 435.000/ $\mu$ L).

Como puede apreciarse, los valores trombocitopénicos se correspondieron a agregaciones cercanas a cero, lo que hace pensar, como se dijo anteriormente, que la disminución de la función plaquetaria se debió a la disminución del recuento plaquetario. En cambio, los valores normales en el número de plaquetas no se correspondieron con los valores bajos de la agregación plaquetaria, sugiriendo que en esas plaquetas si pudiera estar afectada la función. Este comportamiento pudo ser observado en los seis animales estudiados, en algún momento de la infección, lo cual aunado al alto porcentaje de ocurrencia (58%), permite pensar que es un comportamiento bastante generalizado, y no algo casual o debido a alguna individualidad.

Cuando la causa de la disminución de la respuesta de agregación plaquetaria observada en los Beagles del presente trabajo, es ocasionada por la alteración de la función, como la ocurrida en los casos no trombocitopénicos, podría pensarse que se debió a un desorden en la interacción del colágeno con sus receptores glicoproteicos en la superficie plaquetaria, GPVI e integrina  $\alpha_2\beta_1$  a través de los cuales este agonista inicia la activación plaquetaria. También podría deberse a la existencia de plaquetas hipofuncionales, degranuladas (plaquetas exhaustas), debido a que fueron parcialmente activadas durante la infección.

Por otra parte, en el primer pico de infección, con marcada trombocitopenia, el área bajo la curva de agregación plaquetaria (A) (Tabla X), que representa la respuesta de agregación sobre el intervalo de tiempo registrado, mostró tendencia a disminuir, al igual que ocurrió con la pendiente de la curva (P), que expresa la velocidad de



agregación. El otro parámetro de la curva, tiempo de latencia (L), tiempo entre la adición del agonista e inicio de la respuesta, tendió a prolongarse. Jüttner *et al.* (156), también observaron una correlación negativa entre el número de plaquetas y el tiempo de latencia. Esta alteración de los parámetros de la curva de agregación plaquetaria se acompaña con el descenso ya comentado de la disminución en la agregación plaquetaria. No existen en la literatura consultada reportes sobre los parámetros de la curva de agregación plaquetaria y la infección por *A. platys* o por otra infección rickettsial.

Los promedios de los resultados de la secreción plaquetaria de ATP sin corregir (nmoles) (Tabla X) disminuyeron significativamente en los dos picos de infección, coincidiendo con las trombocitopenias, existiendo una total congruencia entre el comportamiento de la secreción plaquetaria y el de la agregación plaquetaria en los periodos trombocitopénicos, observados en los picos de bacteriemia.

En cambio, cuando la secreción de ATP fue corregida para un número determinado de plaquetas ( $10^{11}$ ), la reducción ya no fue significativa. Lo anterior es indicativo de que la disminución de la secreción plaquetaria expresada en nmoles de ATP observada en los picos de infección es debida al descenso del número de plaquetas, indicando que aparentemente la secreción plaquetaria no fue afectada por la infección por *A. platys*.

Este efecto de la corrección de la secreción plaquetaria a un número determinado de plaquetas ya ha sido observado en estudios similares en perros (20, 259). Es conocido que la magnitud de la respuesta es proporcional al número de plaquetas participando en la reacción, y por lo tanto al recuento plaquetario (49).

Por otra parte, en algunos casos llegaron a ocurrir valores normales e inclusive más altos que el valor de preinoculación de secreción plaquetaria en presencia de trombocitopenia. El caso más resaltante fue el del Beagle 3 en donde pudo apreciarse un aumento entre 1.400 y 1.500 veces de la secreción de ATP inducida por colágeno y trombina (5,1 y 8,0)  $\mu$ moles de ATP por  $/10^{11}$  plaquetas respectivamente, al compararla con el valor preinoculación (0,3 y 0,6  $\mu$ moles ATP/ $10^{11}$ ), a pesar de tener un bajo recuento plaquetario ( $46 \times 10^3/\mu$ L). Una posible explicación del aumento de la secreción podría ser el incremento observado en el mismo de 25% de población

aberrante de macroplaquetas densas. Estas macroplaquetas tienen tres veces el contenido de gránulos de las plaquetas livianas, más pequeñas, siendo funcionalmente más activas, exhibiendo una actividad metabólica y funcional mayor por unidad de volumen (63, 160, 161).

A pesar de lo anteriormente mencionado, cuando se analizan los resultados crudos (datos no mostrados), se observa que el 50% de los valores bajos de secreción plaquetaria (expresada en nmoles de ATP) corresponden a valores trombocitopénicos, mientras que el resto se relaciona a contajes normales de plaquetas ( $> 200.000 / \mu\text{L}$ ). Por tanto, solo el 50% de los casos con secreción disminuida podrían atribuirse a la trombocitopenia, la otra mitad pareciera que se debiera a una hipofunción plaquetaria, quizás, como se mencionó anteriormente, debido a activación previa de las plaquetas, ya sea a causa de la propia infección o por la acción de leucocitos activados. Cuando las plaquetas son activadas, sucede un cambio conformacional del receptor del fibrinógeno GPIIb-IIIa, aumentando la afinidad para unir a su ligando (266, 267). La activación de la plaqueta conllevaría a secreción plaquetaria y a disminución parcial o a agotamiento de su contenido granular (plaquetas exhaustas).

Lo anterior se relaciona con lo observado en las micrografías electrónicas (figura 6) en la muestra del perro infectado con el inóculo de *A. platys*, cuando alcanzó el primer pico de infección, en donde pudo evidenciarse la presencia de plaquetas mostrando un citoplasma con filopodios, claro signo morfológico de activación plaquetaria, y con poco contenido de gránulos secretorios, lo que podría indicar activación plaquetaria inducida por la bacteria (68, 167).

En este mismo contexto, otra de las causas de la activación previa de las plaquetas pudieran ser los leucocitos. Las alteraciones observadas en el presente trabajo en los distintos tipos de leucocitos, durante el transcurso de la infección con *A. platys*, son características de la activación de estas células. Se sabe que los leucocitos activados liberan catepsina G, que activa a las plaquetas debido a que, entre otros, facilita la unión del fibrinógeno a la plaqueta.

Por lo anteriormente expuesto, la interpretación de la función plaquetaria debería hacerse cuidadosamente, ya que las características funcionales de las plaquetas durante la fase trombocitopénica podrían ser diferentes de aquellas en la fase de rebote (primer

y segundo periodo de recuperación), en donde el número de plaquetas se acerca a los valores de preinoculación. Los resultados de secreción plaquetaria en sangre total obtenidos en el presente trabajo en perros inoculados con *A. platys*, son los primeros reportados a nivel mundial. Tampoco han sido reportados resultados del efecto de otras rickettsias sobre la secreción plaquetaria.

La concentración plasmática de FvWAg aparentemente no fue afectada por *A. platys*, ya que solo pudo ser observada una disminución no significativa del mismo en el primer pico de infección (Tabla XI). No se encontró en la literatura revisada efecto de la infección con *A. platys* sobre el FvW.

El que el FvW no aumentara en el pico de infección estudiado (primer pico) es indicativo de que no se implantó una rickettsia intraendotelial por *A. platys*, que hubiera podido desarrollar vasculitis, ya que el FvW es considerado un marcador específico de daño vascular, porque se libera de las células endoteliales dañadas. Esto coincide con Baker *et al.* (18), quienes no observaron vasculitis o daño endotelial en ninguno de los tejidos examinados en perros Beagles y Mongrel con infección aguda por *A. platys*.

La afección de las células endoteliales si ha podido ser observada en infecciones por *R. rickettsii* y *R. conorii* (86, 106, 277), presentándose un incremento de los niveles del marcador de daño endotelial (FvWAg) en plasma durante la fase aguda de la infección (106, 300). Este factor también se ha elevado hasta en un 100% en perros con sepsis y síndrome inflamatorio (248), así como en los infectados por piroplasma (191). Por el contrario, se sabe que en otras infecciones, como la ocasionada por *Streptococcus pneumoniae*, los niveles plasmáticos de FvW disminuyen por aumento de su captación en el hígado (117).

Al no haber aparentemente daño endotelial, la trombocitopenia observada en los picos de bacteriemia no pudo deberse a consumo plaquetario por vasculitis. Estos resultados, junto al hecho de que la trombocitopenia es cíclica, sugieren que es poco probable que el daño vascular juegue un papel importante como mecanismo trombocitopénico en esta infección.

#### ***Efecto de la infección experimental con A. platys sobre la hemostasia secundaria***

Por otra parte, no fueron detectadas diferencias significativas en el TTPa de los

animales durante el transcurso de la infección por *A. platys* (Tabla XI), por lo que aparentemente la infección no afectó a la actividad de los factores de la coagulación que intervienen en la vía intrínseca (KAPM, precalicreína, FXII, FXI, FIX, FVIII) y en la vía común (FX, FV, FII y fibrinógeno) de la coagulación sanguínea de los perros.

En cuanto al efecto de *A. platys* sobre el TP, tampoco se evidenció que este organismo ocasionara alteración sobre este tiempo de coagulación, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de TP, previos a la inoculación con *A. platys* y los valores postinoculación de los animales, tanto cuando se examinaron en conjunto (Tabla XI), como por separado (datos no mostrados), mediante análisis no paramétricos, ni para los Beagles 2 y 5, ni para el resto de los Beagles. El que el TP no haya sido afectado a causa de *A. platys* indica que no alteró los factores de la vía extrínseca de la coagulación sanguínea (Factor tisular, FVII), ni de la vía común (FX, FV, FII y fibrinógeno).

Los resultados de TP y TTPa obtenidos en este estudio ayudan a explicar el que no se presentaran hemorragias visibles en los perros infectados con *A. platys*. También indican que durante la infección no se formaron inhibidores, tales como autoanticuerpos contra los factores de la coagulación, o sustancias liberadas por la bacteria, como proteasas bacterianas, las cuales causarían disminución de la actividad de estos factores y por lo tanto prolongación de los tiempos de coagulación.

La no afectación de los tiempos de coagulación en los perros infectados con *A. platys* coincide con lo observado por Wilson (314), quien reporta un tiempo de coagulación activado (TCA) normal (<120 s), en un perro mestizo con infección natural con *A. platys* y serología negativa a *E. canis*. También es similar a lo reportado por Oviedo (222), con TP y TTPa de perros de varias razas y mestizos, no afectados por infección natural con *A. platys*, cuando se compararon con perros controles sanos.

En infecciones por *E. canis*, se reportan resultados variables, que el TP y el TTPa no fueron afectados (137, 140, 141, 171) y con TTPa alargado (65). En perros infectados con *R. rickettsii* se ha visto alargamiento de TTPa y TP normal (71).

Durante el transcurso de la infección (Tabla XI) la concentración de fibrinógeno se incrementó, aunque estos aumentos solo fueron estadísticamente significativos en los picos de infección, coincidiendo con las trombocitopenias. Los valores de fibrinógeno

solo vinieron a asemejarse a los de preinoculación después del segundo pico de infección (recuperación post segundo pico), al final de la fase aguda de la infección.

El incremento de esta proteína probablemente se deba a que es un reactante de fase aguda (193), cuyos valores plasmáticos se elevan durante un amplio rango de infecciones bacterianas y en otras condiciones inflamatorias. En estos procesos patológicos los tejidos dañados activan a los macrófagos, los cuales liberan citokinas proinflamatorias como interleucina 1 (IL-1) e IL-6, y el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), induciendo la síntesis hepática, no solo del fibrinógeno, sino de otras proteínas de fase aguda, en una gran variedad de vertebrados (105, 249).

En el presente trabajo los niveles de fibrinógeno fueron un mejor indicador de inflamación que los leucocitos, ya que no pudo ser evidenciado un leucograma inflamatorio. Por tanto la hiperfibrinogenemia observada evidenció la respuesta generalizada inflamatoria aguda que se desencadenó ante la infección contra *A. platys*.

Este resultado coincide con lo hallado por Thomas (292) en perros, en cuanto a que la medición del fibrinógeno tiene especificidad y sensibilidad similar al recuento de leucocitos para detectar inflamación. También es similar a lo observado por Oviedo (222), quien encontró aumento de la concentración de fibrinógeno en perros infectados naturalmente con *A. platys*. En infecciones producidas por *R. rickettsii* en perros, también se ha evidenciado un aumento del fibrinógeno plasmático (71).

Las altas concentraciones de fibrinógeno observadas durante la infección con *A. platys* Maracay podrían haber tenido un papel compensatorio en la trombocitopenia observada. El papel compensatorio del fibrinógeno en la trombocitopenia se ha sugerido en datos experimentales *in vitro*. Se ha reportado también que el efecto de sustancias bloqueadoras de las plaquetas puede ser antagonizado por un incremento de las concentraciones de fibrinógeno (185).

Por otra parte, aunque no se realizó la medición del tiempo de trombina (TT), para evaluar la calidad del fibrinógeno, el hecho de que no se presentaran sangramientos, aún en los picos de bacteriemia, en donde se manifestó la trombocitopenia, es indicativo de una buena calidad del fibrinógeno y de que la rickettsia no afectó a la estructura de esta molécula. Oviedo (222) reportó que la infección natural de *A. platys* no afectó al TT.

En cuanto al efecto de *A. platys* Maracay sobre el FXIII (Tabla XI) se observó

que el coágulo de fibrina se mantuvo presente en las 24 horas de observación, por lo que no hubo ninguna diferencia con los valores de preinoculación. Debido a que la prueba de medición de la presencia del FXIII permite detectar a aquellos pacientes con riesgo de desarrollar complicaciones hemorrágicas, puede concluirse que la infección experimental con *A. platys* no aumentó el riesgo de desarrollar hemorragias en los perros del presente estudio.

La no alteración del Factor XIII por efecto de esta rickettsia coincide con lo obtenido por Oviedo (222) en perros infectados naturalmente con *A. platys*. En otras infecciones, en cambio, ha sido reportada deficiencia de FXIII, como en ratas con bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*, observándose también hiperfibrinectinemia (164), reflejando el papel regulatorio que tiene el FXIII sobre algunas proteínas (116).

En conclusión, la no alteración del TP y del TTPa, la concentración aumentada de fibrinógeno, presencia del FXIII, y la no manifestación clínica de sangramiento en ninguno de los animales, hacen poco probable que los Beagles del presente estudio tuvieran una coagulopatía clínica atribuible a la infección por *A. platys* Maracay.

#### ***Efecto de la infección experimental con A. platys Maracay sobre la fibrinólisis***

Durante todo el curso de la infección experimental, los valores de dímero D permanecieron menores de 200 ng/mL (Tabla XII), por lo que aparentemente *A. platys* no afectó a la fibrinólisis. El que no se haya incrementado el dímero D durante la infección es indicativo de que *A. platys* Maracay no provocó un estado hipercoagulable inducido por exceso de generación de trombina y activación plaquetaria, por tanto no hubo formación de fibrina intravascular ni posterior fibrinólisis, procesos que pueden ser estimulados por estados inflamatorios y otras formas de daño tisular, como la ocurrida en la CID, siendo esta prueba de gran utilidad para estos estudios (115, 118, 217, 278).

Estos resultados coinciden con Oviedo (222), quien tampoco evidenció efecto de *A. platys* sobre la concentración de dímero D en perros infectados naturalmente con esta rickettsia. En infecciones con *R. rickettsii* en perros se ha demostrado la elevación de la concentración de PDF en 50% de los perros estudiados (71), al igual que en humanos también infectados con *R. rickettsii* y *R. conorii* (80). También en babesiosis canina se ha reportado PDF y dímero D incrementados (99).

Por otra parte, los tiempos de lisis de euglobulina (TLE) alcanzados en los perros

postinoculación con *A. platys* Maracay fueron similares a los obtenidos previo a la infección (Tabla XII), y ya que esta variable es una prueba global para fibrinólisis, representando el balance entre las actividades del activador del plasminógeno tisular (APt) y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (IAP-1), pareciera que la infección por *A. platys* Maracay no provocó un estado hiperfibrinolítico en los perros estudiados, no evidenciándose, por tanto, un aumento de activadores (u otras enzimas proteolíticas) de la fibrinólisis. Estos resultados apoyan la no alteración del dímero D antes mencionada.

Por otra parte, se está considerando al TLE como indicador de daño endotelial. Algunos estudios *in vitro* reportan un efecto directo de la proteína C reactiva (CRP) sobre las células endoteliales (28, 77). Así también Boudjeltia *et al.* (34) observaron una correlación significativa entre la proteína C reactiva y TLE en una población humana no seleccionada y con síndrome no inflamatorio. Estos últimos autores proponen la medición de la CRP y el TLE como marcadores de disfunción endotelial semejantes al FvW y a la trombomodulina.

El presente estudio, al no evidenciar diferencia entre los valores de TLE pre y postinoculación, sugiere ausencia de daño endotelial en infección por *A. platys* Maracay, corroborando la no alteración de los niveles de antígeno del FvW obtenida. Esta ausencia de daño endotelial, además, está acorde con los resultados obtenidos de ausencia de activación de la fibrinólisis, ya que se sabe que el endotelio juega un papel primordial en el control de la tasa de fibrinólisis y que daños al endotelio afectan a la fibrinólisis.

Por otra parte, el índice de coagulación intravascular diseminada (CID) de los perros fue calculado en 0,045, sugiriendo que la infección por *A. platys* Maracay no provocó CID en los Beagles del presente trabajo, ya que según Marbet y Griffith (196) este índice debe encontrarse entre 0,15 y 0,40 para que pueda ser considerado como una CID suave, y si es superior a 0,40 se trataría de una CID fuerte. Además, en el presente estudio no fueron observadas, como consecuencia de la infección por *A. platys*, otras alteraciones hemostáticas típicas de la CID como: prolongación del TP y del TTPa, disminución del fibrinógeno, elevación de la concentración de dímero-D y presencia de esquistocitos, corroborando la ausencia de CID durante la infección por *A. platys*

Maracay. Lo anterior está de acuerdo con la no alteración del TLE ni del FvW, sugiriendo la ausencia de daño endotelial y ausencia de CID en los perros durante la infección por *A. platys*. No existen reportes en la literatura sobre la relación entre *A. platys* y la CID. Daño vascular con posterior CID ha sido descrito en rickettsiosis canina y humana (71).

Por lo anteriormente expuesto, el mecanismo de la trombocitopenia observado en esta infección experimental con *A. platys* tampoco fue debido al aumento de la utilización de plaquetas por coagulación intravascular diseminada (CID).



## CONCLUSIONES

- 1) El organismo intraplaquetario observado como inclusiones basofílicas en los FCB y, dentro de vacuolas en el citoplasma de las plaquetas observado por MET, fue confirmado como una cepa *Anaplasma platys*, la cual fue denominada *A. Platys* Maracay, demostrándose mediante análisis de la secuencia del ADNr 16S, aislado de uno de los Beagles inoculado experimentalmente con esta cepa, la cual tiene una alta similitud con las cepas *A. platys* Venezuela y *A. platys* Lara, así como con algunas cepas de este anaplasma reportadas en otros países.
- 2) Todos los perros desarrollaron la infección típica producida por *A. platys*, con un periodo de incubación promedio de 8 días, presentándose bacteriemia y trombocitopenia cíclicas cada 10 días aproximadamente, evidenciándose tres picos de bacteriemia en el mes de observación. La temperatura corporal se elevó durante todos los picos, manifestándose fiebre en algunos casos. La seroconversión fue registrada en la cuarta semana postinfección con un aumento de títulos de anticuerpos anti-*A. platys*.
- 3) La trombocitopenia observada aparentemente no se debió a la supresión de la producción plaquetaria en la médula ósea, ni tampoco a un aumento de su utilización debido a daño endotelial o a CID. La coincidencia de las trombocitopenias con los picos de bacteriemia sugieren un daño directo de la plaqueta por *A. platys*. Sin embargo, en la etapa final de la fase aguda de la infección, con baja bacteriemia, esta trombocitopenia aparentemente se presentó también como consecuencia de un mecanismo inmunitario, como lo sugiere la presencia de anticuerpos antiplaquetas en este periodo.

- 4) La infección provocó una anemia normocítica, normocrómica en los picos de bacteriemia, evidenciándose la presencia de eritrofagocitosis. También pudo observarse disminución no significativa del recuento de leucocitos y presencia de leucocitos activados, así como incrementos de hasta 30% de macroplaquetas.
- 5) Se observó una disminución de la función plaquetaria (agregación y secreción) en los picos de bacteriemia, coincidente con la disminución del recuento plaquetario. También se apreció en algunos casos descenso de la agregación plaquetaria con recuentos normales de plaquetas, sugiriendo presencia de inhibidores plaquetarios en la sangre o de plaquetas previamente activadas (exhaustas).
- 6) Aparentemente no ocurrió daño endotelial a causa de la infección por *A. platys* Maracay, evidenciándose por la no alteración del FvW, ni del tiempo de lisis de euglobulina.
- 7) La infección experimental con *A. platys* Maracay no aumentó el riesgo de desarrollar hemorragias en los perros, demostrado por la no alteración de los tiempos de coagulación TP y TTPa, ni del FXIII de la coagulación.
- 8) La concentración de fibrinógeno se incrementó significativamente en todos los picos de infección, por lo que puede ser utilizada como marcador importante de esta infección. También pudo apreciarse trombocitosis en la etapa final de la fase aguda, siendo otro indicador de inflamación e infección.
- 9) La infección no provocó hiperfibrinólisis, ya que el dímero D y el tiempo de lisis de euglobulina no fueron afectados. Aparentemente tampoco se desarrolló coagulación intravascular diseminada (CID).

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Abarca K, López J, Perret C, Guerrero J, Godoy P, Veloz A, Valiente-Echeverría F, León U.** *Anaplasma platys* in dogs, Chile. *Emerg Infect Dis.* 13(9): 1392-5. 2007.
2. **Abbott KC, Vukelja SJ, Smith CE, McAllister CK, Konkol KA, O'Rourke TJ, Holland CJ, Ristic M.** Hemophagocytic syndrome: a cause of pancytopenia in human ehrlichiosis. *Am J Hematol.* 38: 230-4. 1991.
3. **Abrams CS, Brass LF.** Platelet signal transduction. En: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* Editado por: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, 5<sup>a</sup> edic. Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 39. 614 p. Philadelphia, EUA. 2006.
4. **Aguirre E, Tesouro MA, Ruiz L, Amusatogui I, Sainz A.** Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 53(4):197-200. 2006.
5. **Albrich WC, Rimland D.** Clostridium difficile: association with thrombocytosis and leukocytosis. *South Med J.* 100 (2):149-51. 2007.
6. **Altman R y Scazziotto A.** El mecanismo de la hemostasia normal. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia.* 7: 95-109. 1994.
7. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myer EW, Lipman D.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-10. 1990.
8. **Anderson BE, Sumner JW, Dawson JE, Greene CR, Olson JG, Fishbein DB, Olsen-Ramussen M, Holloway BP.** Detection of the etiologic agent of human

ehrlichiosis by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 30(4):775-80. 1992.

9. **Arraga CM.** Ehrlichiosis canina en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Reporte de 55 casos. Rev. Cient. FCV-LUZ. 2(2):41-52. 1992.

10. **Arraga CM, Parra OC, Palmar M, Chango RE, Alvarado MC.** *Ehrlichia platys*: preparación del antígeno y uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en caninos y humanos. Rev Cient FCV-LUZ. 7(2): 99-109. 1997.

11. **Arraga CM, Palmar M, Parra O, Salas P.** Fine structural characterization of a Rickettsia-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis. J Med Microbiol. 48: 991-7. 1999.

12. **Arraga CM.** Actualización en ehrlichiosis y rickettsia plaquetaria en animales y humanos. Carabobo. 19 de Julio. Valencia. Venezuela- SOVEMEVEPA. 2000.

13. **Arraga CM.** Manual de Laboratorio: Diagnóstico de agentes hemotrópicos mediante la utilización de frotis de capa blanca. Taller de Laboratorio en Agentes Hemotrópicos. Caracas 12 de mayo. Venezuela- SOVEMEVEPA. 2001.

14. **Arraga CM, Palmar M, Parra O, Salas P.** *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in Dogs from Maracaibo, Venezuela: An ultrastructural study of experimental and natural infections. Vet Pathol. 40: 149-56. 2003.

15. **Asby B, Colman RW, Daniel JL, Kunapuli SP, Smith JB.** Platelet stimulatory and inhibitory receptors. En: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles & Clinical Practice. Editado por: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 4ª edic. Lippincott Williams & Wilkins. pp 505-20. Philadelphia, EUA. 2001.

16. **Aster RH.** Pooling of platelet in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. J Clin Invest. 45(5): 645-57. 1966.

17. **Bachmann F.** Trastornos de la fibrinólisis y empleo de agentes fibrinolíticos. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E, Lichtman MAM Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn. 1ª edic. Vol 2. Marbán Libros. Cap. 136. p 1829. Madrid, España. 2005.

18. **Baker DC, Simpson M, Gaunt SD, Corstvet, RE.** Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. *Vet Pathol.* 24 (5): 449-53. 1987.
19. **Baker DC, Gaunt SD, Babin SS.** Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res.* 49 (7): 1014-6. 1988.
20. **Barr SC, Ludders JW, Looney A, Gleed R, Erb H.** Platelet aggregation in dogs after sedation with acepromazine and atropine and during subsequent general anesthesia and surgery. *Am J Vet Res.* 53 (11): 2067-70. 1992.
21. **Beaufils JP, Inokuma H, Martin-Granel J, Jumelle PH, Barbault-Jumelle M, Brouqui P.** *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. *Rev Med Vet.* 153(2): 85-90. 2002.
22. **Behl R, Klein MB, Dandele L, Bach RR, Goodman JL, Key NS.** Induction of tissue factor procoagulant activity in myelomonocytic cells inoculated by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Thromb Haemost.* 83(1):114-8. 2000.
23. **Beich JFF, Zoma AA, Richards IM, McLaughlin K, Forbes CD, Sturrock RD.** Vascular damage and Factor VIII related antigen in the rheumatic diseases. *Rheumatol. Int.* 7:107-11. 1987.
24. **Berchtold P, McMillan R, Tani P, Sommerville-Nielsen S, Blanchette VS.** Autoantibodies against platelet membrane glycoproteins in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 74:1600-2. 1989.
25. **Berridge MJ.** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361:315-25. 1993.
26. **Bexfield NH, Villiers EJ, Herrtage ME.** Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. *J Small Anim Pract.* 46(11): 543- 8. 2005.
27. **Blanco AN, Martínez A.** Determinación de Factor XIII. En: *Manual de Hemostasia y Trombosis.* Grupo CLAHT. Editado por: Kordich L, Sánchez J, Vidal H, De Campos C.

edic. Imprenta de la Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. p 02. Argentina. 1990.

28. **Blann AD, Lip GY.** Effects of C-reactive protein on the release of von Willebrand factor, E-selectin, thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood Coagul Fibrinol.* 14: 335-40. 2003.

29. **Bloom JC, Blackmer SA, Bugelski PJ, Sowinski JM, Saunders LZ.** Gold-induced immune thrombocytopenia in the dog. *Vet Pathol.* (5):492-9. 1985.

30. **Boneu B, Sie P, Caranobe C, Robert A.** Macrothrombocytosis and idiopathic thrombocytopenic purpura: effect of anticoagulant and prior fixation on the determination of platelet volume using the Coulter system. *Nouv Rev Fr Hematol.* 28 (1):15-8. 1986.

31. **Booth NA, Bachmann F.** Plasminogen–Plasmin System. En: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice.* Editado por: RW Colman, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, 5ª edic. Lippincott Williams & Wilkins. Cap 18. 100 p. Philadelphia, EUA. 2006.

32. **Borjesson DL, Brazzell JL, Feferman R.** Platelet dysfunction after association with *Anaplasma phagocytophilum* *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci.* 1063:413-5. 2005.

33. **Born GVR.** Aggregation of platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194: 927-9. 1962.

34. **Boudjeltia KZ, Piagnerelli M, Brohée D, Guillaume M, Cauchie P, Vincent JL, Remacle C, Bouckaert Y.** Relationship between CRP and hypofibrinolysis: Is this a possible mechanism to explain the association between CRP and outcome in critically ill patients?. *Thrombosis Journal* 2(1):7. 2004.

35. **Boylan B, Chen H, Rathore V, Paddock C, Salacz M, Friedman KD, Curtis BR, Stapleton M.** Anti-GP VI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GP VI/FcR gamma-chain complex from the human platelet surface. *Blood.* 104: 1350–5. 2004.

36. **Bradfield JF, Vore SJ, Pryor WH.** *Ehrlichia platys* infection on dogs. Lab Anim Sci. 46(5):565-8. 1996.
37. **Brandao LP, Hasegawa MY, Hagiwara MK, Kohayagawa A.** Platelet aggregation studies in acute experimental canine ehrlichiosis. Vet Clin Pathol. 35(1):78-81. 2006.
38. **Branehög I, Kutti J, Weinfeld A.** Platelet survival and platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Br J Haematol. 27(1):127-43. 1974.
39. **Brass LF, Joseph SK.** A role for inositol triphosphate in intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization and granule secretion in platelets. J Biol Chem. 260:1572-79. 1985.
40. **Brecher G, Cronkite EP.** Morphology and enumeration of human blood platelets. J Appl Physiol 3(6): 365-77. 1950.
41. **Brooks M.** Management of canine von Willebrand's disease. Probl Vet Med. 4 :636. 1992.
42. **Brooks M.** Coagulopathies and thrombosis. En: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat. Editado por: Ettinger SJ y Feldman EC. 5<sup>a</sup> edic. Vol 2. Saunders Company. pp 1829-41. Philadelphia, EUA. 2000.
43. **Brooks M.** Von Willebrand disease. En: Schalm's Veterinary Hematology, Editado por: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, 5<sup>a</sup> edic. Blackwell Publis. Profess. pp 509-15. Philadelphia, EUA: 2006.
44. **Brown GK, Martin AR, Roberts TK, Aitken RJ.** Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. Aust Vet. 79:554-8. 2001.
45. **Brown SJ, Simpson KW, Baker S, Spagnoletti MA, Elwood CM.** Macrothrombocytosis in Cavalier King Charles Spaniels. Vet Rec. 135:281-83. 1994.

46. **Cade JF, Robinson TF.** Coagulation and Fibrinolysis in the Dog. *Can. J. Comp. Med.* 39: 296. 1975.
47. **Callan MB, Aljamali MN, Margaritis O, Griot-Wenk ME, Pollak ES, Werner P, Giger U, High KA.** A novel missense mutation responsible for factor VII deficiency in research Beagle colonies. *J Thromb Haemost.* 4: 2616-22. 2006.
48. **Camerer E, Kolsto AB, Prydz H.** Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res.* 81:1-41. 1996.
49. **Cardinal DC y Flower RJ.** "The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood". *J Pharm Meth.* 3: 135. 1980.
50. **Cardozo GP, Oliveira LP, Zisson VG, Donini IAN, Roberto PG, Marins M.** Analysis of the 16S rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil. *Bras J Microbiol.* 38: 478-79. 2007.
51. **Carlyon JA, Fikrig E.** Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol.* 5(11):743-54. 2003.
52. **Cartwright GE, Lauritsen MA, Humphreys S, Jones PJ, Merrill IM, Wintrobe MM.** The anemia of infection. II. The experimental production of hypoferrremia and anemia in dogs. *J Clin Invest.* 25(1):81-6. 1946.
53. **Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F.** Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica.* 92: 694-7. 2007.
54. **Chang WL, Pan MJ.** Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. *J Clin Micr.* 34(12): 3142-6. 1996.
55. **Charbit B, Mandelbrot L, Samain E, Baron G, Haddaoui B, Keita H, Sibony O, Mahieu-Caputo D.** The decrease of fibrinogen is an early predictor of the severity of



postpartum hemorrhage. *J Thromb Haemost.* 5:266–73. 2007.

56. **Chrono-log Corporation.** Manual de Instrucciones para el lumi-agregometro-calciio ionizado de sangre completa modelo 560-Ca. Havertown, EUA. 2005.
57. **Clancy R, Jenkins E, Firkin B.** Qualitative platelet abnormalities in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 286 (12):622-6. 1972.
58. **Cockcroft S, Thomas GMH.** Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem J.* 288: 1–14. 1992.
59. **Codner EC, Farris-Smith LL.** Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 189 (1): 47-50. 1986.
60. **Coller BS y French DL.** Trastornos plaquetarios cualitativos hereditarios. En: *Williams Hematología.* Editor por: Beutler E. Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap. 119. pp. 1551-81. Madrid, España. 2005.
61. **Colman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J, Marder VJ.** Overview of hemostasis. En: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles & Clinical Practice.* Editado por: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 5ª edic. Lippincott Williams & Wilkins. Cap 1. pp 3-16. Philadelphia, EUA. 2006.
62. **Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV Jr, Coughlin SR.** Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature.* 381: 516–19. 1996.
63. **Corash L, Tan H, Gralnic HR.** Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. I. Relationship between buoyant density, cell volume, and ultrastructure. *Blood.* 49(1):71-87. 1977.
64. **Corriveau DM, Fritsma GA.** En: *Hemostasis and Thrombosis in the Clinical Laboratory.* Editada por: Corriveau DM, Fritsma G A. Lippincott Company. pp 278-303. EUA. 1988.

65. **Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Mastellone V, Manco A, Lombardi P, Ciaramella P, Avallone L.** Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 53(10):546-8. 2006.
66. **Cortese L, Terrazzano G, Piantedosi D, Sica M, Prisco M, Ruggiero G, Ciaramella P.** Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Vet J.* 188(1):118-21. 2011.
67. **Costa J.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm InfeccMicrobiol Clin.* 22 (5):299-305. 2004.
68. **Cowell R L, Tyler R D, Meinkoth J H.** *Diagnostic Cytology and Haematology of the Dog and Cat.* 2<sup>a</sup> edic. Mosby.San Luis, EUA. 1999.
69. **Cramer EM, Fontenay M.** Platelets: structure related to function. En: *Hemostasis and Thrombosis; Basic principles and Clinical Practice.* Editado por: Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN. 5<sup>a</sup> edic. Lippincott Williams & Wilkins. 462 p. Philadelphia, EUA. 2006.
70. **Dale GL, Wolf RF, Hynes LA, Friese P, Burstein SA.** Quantitation of platelet life span in splenectomized dogs. *Exp Hematol.* 24:518-23.1996.
71. **Davidson MG, Breitschwerdt EB, Walker DH, Levy MG, Carlson CS, Hardie EM, Grindem CA, Nasisse MP.** Vascular permeability and coagulation during *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. *Am J Vet Res.* 51:165-70. 1990.
72. **Dawood BB, Wilde J, Watson SP.** Reference curves for aggregation and ATP secretion to aid diagnose of platelet-based bleeding disorders: Effect of inhibition of ADP and thromboxane A<sub>2</sub> pathways. *Platelets.* 18(5):329-45. 2007.
73. **Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW.** Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Clin Microbiol.* 32(11): 2725-8. 1994.

74. **Dawson JE, Biggie KL, Warner CK, Cookson K, Jenkins S, Levine JF, Olson JG.** Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *Am J Vet Res.* 57(8):1175-9. 1996.
75. **de la Fuente J, Torina A, Naranjo V, Nicosia S, Alongi A, La Mantia F, Kocan KM.** Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veter Res.* 2:24. 2006.
76. **Deckmyn H, Zhang J, Van Houtte E, Vermynen J.** Production and nucleotide sequence of an inhibitory human IgM autoantibody directed against platelet glycoprotein Ia/IIa. *Blood.* 84(6):1968-74. 1994.
77. **Devaraj S, Xu DY, Jialal I.** C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation.* 107: 398-404. 2003.
78. **Díaz A.** Enfermedad de von Willebrand adquirida. Aspectos generales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 20(1). 2004.
79. **Dodds WJ.** von Willebrand's disease in dogs. *Med Vet Pract.* 65: 681-6. 1984.
80. **Drancourt M, Alessi MC, Levy PY, Juhan-Vague I, Raoult D.** Secretion of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by *Rickettsia conorii*- and *Rickettsia rickettsii*-infected cultured endothelial cells. *Infect Immun.* 58(8):2459-63. 1990.
81. **Dromigny A, Triadou P, Lesavre P, Morel-Kopp MC, Kaplan C.** Lack of platelet response to collagen associated with autoantibodies against glycoprotein (GP) Ia/IIa and Ib/IX leading to the discovery of SLE. *Hematol Cell Ther.* 38(4):355-7. 1996.
82. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR.** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the orden *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with

*Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HE agent” as subjective synonyms *Ehrlichia phagocytophilia*. Int J Syst Evol Microbiol. 51(6):2145-65. 2001.

83. **Dumler JS, Brouqui P.** Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. Expert Rev Mol Diagn. 4 (4): 559-69. 2004.

84. **Dumler JS, Rikihisa Y, Dasch A.** Family *Anaplasmataceae*. Genus I. *Anaplasma*. En: The Proteobacteria Part C, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Editado por: Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT. 2<sup>a</sup> edic. Vol 2. Springer. p117. New York, EUA. 2005.

85. **Eddlestone SM, Gaunt TM, Neer CM, Boudreaux CM, Gill A, Haschke E, Corstvet RE.** PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. Exp Parasitol. 115: 205-10. 2007.

86. **Elghetany MT, Walker DH.** Hemostatic changes in Rocky Mountain spotted fever and Mediterranean spotted fever. Am J Clin Pathol. 112:159-68. 1999.

87. **Ellies LG, Ditto D, Levy GG, Wahrenbrock M, Ginsburg D, Varki A, Le DT, Marth JD.** Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands. Proc Natl Acad Sci. 99:10042–7. 2002.

88. **Ettinger SJ, Feldman EC.** Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Editado por: Ettinger SJ y Feldman EC. 5<sup>a</sup> edic. Vol 2. Saunders Company. p 1827. Philadelphia, EUA. 2000.

89. **Fanning WL, Marcus LC, Valigorsky JM.** A case of transfusion-induced babesiosis. J Am Med Assoc. 248: 465-7. 1982.

90. **Feldman BF, Zinkl JG, Schalm OW, Franco VR, Bergamo TC.** Schalm’s Veterinary Hematology. 5<sup>a</sup> edic. Blackwell Publis. Profess. p 1334. Iowa, EUA. 2006.

91. **Forsythe LT, Jackson ML, Meric SM.** Whole blood platelet aggregation in uremic

dogs. Am J Vet Res. 50 (10):1754-7. 1989.

92. **Fouzas S, Mantagou L, Skylogianni E, Varvarigou A.** Reactive thrombocytosis in febrile young infants with serious bacterial infection. Indian Pediatr. 47(11): 937-43. 2010.

93. **Fox JEB, Reynolds CC, Johnson MM.** Identification of glycoprotein Ib-beta as one of the major proteins phosphorylated during exposure of intact platelets to agents that activate cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem. 262:12627-31. 1987.

94. **Francis CW, Marder VJ.** Physiologic Regulation of Fibrinolysis. En: Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Editado por: RW Colman, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 5ª edic. Lippincott Williams & Wilkins. Cap 69. p100. Philadelphia, EUA. 2006.

95. **Franco VR, Bergamo TC, Ferreira AD, Antunes L, Gouveia K. da Silva CH, Dalcin L.** Co-infection by *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs diagnosed by PCR. Act Sci Vet. 37(3): 281-83. 2009.

96. **French TW, Harvey JW.** Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. Am J Vet Res. 44 (12): 2407-11. 1983.

97. **Fukami MH, Holmsen H, Kowalska MA, Niewiarowski S.** Platelet Secretion. En: Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Editado por: RW Colman, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 4ª edic. Lippincott Williams & Wilkins. pp 561-73. Philadelphia, EUA. 2001.

98. **Funk CD.** Platelet eicosanoids. En: Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Editado por: RW Colman, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 4ª edic. Lippincott Williams & Wilkins. pp 533-9. Philadelphia, EUA. 2001.

99. **Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Solano-Gallego L.** Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. Vet Parasitol. 134(1-2):77-85. 2005.

100. **Garg SK, Amoroi EL, Karpatkin S.** Use of the megatrombocyte as an index of megakaryocyte number. *N Engl J Med.* 284: 11-7.1971.
101. **Gaunt SD, Baker DC, Babin SS.** Platelet aggregation studies in dog with acute *Ehrlichia platys* infection. *Am J Vet Res.* 51(2):290-3. 1990.
102. **Gaunt SD, Corsvet R, Brennan R, Berry C, Neer M.** Platelet-Associated IgG and Antibodies to platelet proteins in dogs with *Ehrlichia canis* infection. *Vet Pathol.* 33(5): 557. 1996.
103. **Gaunt SD, Beall M, Stillman B, Lorentzen L, Diniz PP, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB.** Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit & Vectors.* 3(33):1-10. 2010.
104. **Geczy CL.** Cellular mechanisms for the activation of blood coagulation. *Int Rev Cytol.* 152: 49–108. 1994.
105. **Gentry PA.** Comparative aspects of blood coagulation. *Vet J.* 16 8:238–51. 2004.
106. **George F, Brouqui P, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M, Brisson C, Raoult D, Sampol J.** Demonstration de *Rickettsia conorii*-induced endotelial injury in vivo by measuring circulating endotelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood.* 82(7): 2109-16. 1993.
107. **George JN, Rizvi M.** Trombocitopenia. En *Williams Hematología.* Editado por: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap. 117. pp 1495. Madrid, España. 2005.
108. **Gerrard JM, White JG, Rao GH, Townsend D.** Localization of platelet prosta glandin production in the platelet dense tubular system. *Am J Pathol.* 83:283- 98. 1976.

109. **Ginsburg D.** Enfermedad de Von Willebrand. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic Vol. 2. Marbán Libros. Cap. 135. p. 1813. Madrid, España. 2005.
110. **Glaze MB y Gaunt SD.** Uveitis associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. J Am Vet Med Assoc. 189(8):916-7. 1986.
111. **Gopegui RR, Feldman BF.** Acquired and inherited platelet dysfunction in small animals. Comp Cont Educ. 20(9): 1039-53. 1998.
112. **Gottumukkala VN, Sharma SK, Philip J.** Assessing platelet and fibrinogen contribution to clot strength using modified thromboelastography in pregnant women. Anesth Anal. 89:1453-5. 1999.
113. **Grauer GF, Rose BJ, Toolan L, Thrall MA, Colgan SP.** Effects of low-dose aspirin and specific thromboxane synthetase inhibition on whole blood platelet aggregation and adenosine triphosphate secretion in healthy dogs. Am J Vet Res. 53(9):1631-5. 1992.
114. **Green RA, Thomas JS.** Hemostatic disorders: coagulopathies and thrombosis. En: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Editado por: Ettinger SJ y Feldman EC. Vol II. Saunders Company. pp 1946-61. Philadelphia, EUA. 1990.
115. **Greenberg CS, Devine DV, McCrae KM.** Measurement of plasma fibrin D-dimer levels with the use of a monoclonal antibody coupled to latex beads. Am J Clin Pathol. 87(1): 94-100. 1987.
116. **Greenberg CS, Sane DC, Lai TS.** Factor XIII and Fibrin Stabilization. En: Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Editado por: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 5ª edic. Lippincott Williams & Wilkins. pp 721. Philadelphia, EUA. 2006.

117. **Grewal PK, Uchiyama S, Ditto D, Varki N, Le DT, Nizet V, Marth JD.** The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat Med.* 14(6): 648–55. 2008.
118. **Griffin A, Callan MB, Shofer FS, Giger U.** Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. *Am J Vet Res.* 64(12):1562-9. 2003.
119. **Grindem CB, Breitschwerdt EB, Perkins PC, Cullins LD, Thomas TJ, Hegarty C.** Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine rocky mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 35 (1): 56-61. 1999.
120. **Gutiérrez CN, Martínez M, Arraga C, Bretana A, Pacheco I, Comach G.** Ultrastructural identification of *Ehrlichia sp* in an experimentally infected dog in Venezuela. *Invest Clin.* 40: 165-77. 1999.
121. **Gutiérrez CN, Martínez M, Sánchez E, De Vera M, Rojas M, Ruiz J, Triana F.** Cultivation and molecular identification of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela. *Vet Clin Pathol.* 37(3): 258-65. 2008.
122. **Haberichter SL, Montgomery RR.** Structure and Function of Von Willebrand Factor. En: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice.* Editado por: RW Colman, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 5<sup>a</sup> edic. Lippincott Williams & Wilkins. pp 721. Philadelphia, EUA. 2006.
123. **Hajjar KA.** Mecanismos moleculares de la fibrinólisis. En: *Williams Hematología.* Editado por: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1<sup>a</sup> edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap. 116. pp 1479-93. Madrid, España. 2005.
124. **Hajjar KA, Esmon NL, Marcus AJ, Muller WA.** Función vascular en la hemostasia. En: *Williams Hematología.* Editado por: Beutler E, Lichtman MA, Coller B,



Kipps T, Seligsohn U. 1<sup>a</sup> edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap.114. pp1451-69. Madrid, España. 2005.

125. **Hancock SI, Breitschwerdt EB, Pitulle C.** Differentiation of Ehrlichia platys and E. equi infections in dogs by using 16S ribosomal DNA-based PCR. J Clin Microbiol. 39 (12): 4577-8. 2001.

126. **Harrus S, Waner T, Eldor A, Zwang E, Bark H.** Platelet dysfunction associated with experimental acute ehrlichiosis. Vet Rec. 139 (12): 290-3. 1996a.

127. **Harrus S, Waner T, Weiss DJ, Keysary A, Bark H.** Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet Immunol Immunopathol. 51(1-2):13-20. 1996b.

128. **Harrus S, Aroch I, Lavy E, Bark H.** Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. Vet. Rec. 141(10): 247-50. 1997.

129. **Hartwig JH, Barkalow K.** Polyphosphoinositide synthesis and platelet shape change. Curr Opin Hematol. 4: 351-6. 1997.

130. **Harvey JW, Simpson, Gaskin JM.** Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. J Infect Dis. 137(2):182-8. 1978.

131. **Harvey JW.** Canine thrombocytic ehrlichiosis. En: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Editado por: Greene CG. 2<sup>a</sup> edic. WB Saunders. pp. 147-9. Philadelphia, EUA. 1998.

132. **Heilman E, Friese P, Anderson S, George JN, Hanson SR, Burstein SA, Dale GL.** Biotinylated platelets: a new approach to the measurement of platelet life span. Br J Haematol. 85(4): 729-35. 1993.

133. **Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG.** The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. Ann N Y Acad Sci. 1063:374-82. 2005.

134. **Hibler SC, Greene GE.** Rickettsial infections in dogs. Part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Comp Cont Educ.* 8 (2): 106-14. 1986.
135. **Hildebrandt PK, Conroy JD, McKee AE, Nyindo MBA, Huxsoll DL.** Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infect Immun.* 7 (2): 265-71. 1973.
136. **Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S.** Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature.* 349: 617–20. 1991.
137. **Hribernik T.** Canine ehrlichiosis. *Comp Contin Educ Support Pract Vet.* 3 (11): 997-1002. 1981.
138. **Huang H, Unver A, Pérez MJ, Orellana NG, Rikihisa Y.** Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. *Braz J Microbiol.* 36 (3): 211-6. 2005.
139. **Hulme B, Pitcher PM.** Rapid latex-screening test for detection of fibrin/fibrinogen degradation products in urine after renal transplantation. *Lancet.* 6: 6-8. 1973.
140. **Huxsoll DL, Hildebrandt PK, Nims RM, Walker JS.** Tropical canine pancytopenia. *J Am Vet Med Assoc.* 157 (11):1627-32. 1970.
141. **Huxsoll DL, Amyx HL, Hemelt IE, Hildebrandt PK, Nims RM, Gochenour Jr.WS.** Laboratory Studies of tropical canine pancytopenia. *Exp Parasitol.* 31: 53-9. 1972.
142. **Hynes RO.** Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 10: 673-87. 2002.
143. **Ichinose A, Kisiel W, Fujikawa K.** Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *Lett.* 175 (2): 412-8. 1984.
144. **Ingerman C, Smith BJ, Silver MJ.** Direct measurement of platelet secretion in whole blood. *Thromb Res.* 16:335-44. 1979.

145. **Ingerman-Wojenski C, Smith BJ, Silver MJ.** Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets. *J Lab Clin Med.*101:44-52. 1983.
146. **Ingerman-Wojenski C, Silver MJ.** A Quick Method for Screening Platelet Dysfunctions using the Whole Blood Lumi-aggregometer. *Thromb Haemost.* 51:154-6. 1984.
147. **Ingram G.** The determination of plasma fibrinogen by clot- weight method. *Biochem J.* 5: 583. 1952.
148. **Inokuma H, Raoult D, Brouqui P.** Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* in Okinawa Island, Japan. *J Clin Microbiol.* 38(11): 4219-21. 2000.
149. **Inokuma H, Fujii K, Okuda M, Onishi T, Beaufils JP, Raoult D, Brouqui P.** Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon groESL and the citrate synthase gene (gltA) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(5):1132-6. 2002.
150. **Jackson ML, Searcy GP, Olexson DW.** The effect of oral phenylbutazone on whole blood platelet aggregation in the dog. *Can J Comp Med.* 49 (3):271-7. 1985.
151. **Jenny NS, Lundblad RL, Mann KG.** Thrombin. En: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles & Clinical Practice.* Editado por: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 5<sup>a</sup> edic. Lippincott Williams & Wilkins. Cap10 p195. Philadelphia, EUA. 2006.
152. **Jin J, Quinton TM, Zhang J.** Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A<sub>2</sub> generation in human platelets requires coordinates signaling through integrin alpha (IIb) beta (3) and ADP receptors. *Blood.* 99:193-98. 2002.
153. **Johnstone IB, Crane S.** Von Willebrand's disease in two families of Doberman Pinschers. *Can Vet J.* 22 (8): 239-43. 1981.

154. **Joris I, Majno G, Corey EJ, Lewis RA.** The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4: endothelial contraction. *Am J Pathol.* 126:19–24. 1987.
155. **Jurk K, Kehrel BE.** Physiology and biochemistry of platelets. *Sem Thromb and Haem.* 31(4):381-91. 2005.
156. **Jüttner C, Rodríguez M, Fragío C.** Optimal conditions for simultaneous measurement of platelet aggregation and ATP secretion in canine whole blood. *Res Vet Sci.* 68(1): 27-32. 2000.
157. **Kakoma I, Carson CA, Ristic M, Stephenson EM, Hildebrandt PK, Huxsoll DL.** Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. *Infect Immun.* 1: 242-7. 1978.
158. **Kakoma I, Sainz A, Tesouro M, Amusatogui I, Kim CH, Biggerstaff J, McPeak J, Levy MG.** Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis. Towards universal case definition. *Ann N Y Acad Sci.* 916:396-403. 2000.
159. **Kalbantner K, Baumgarten A, Mischke R.** Measurements of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. *Vet J.* 185(2):144-51. 2010.
160. **Karpatkin S.** Human antiplatelet antibody. En: *Platelet Function testing. Proceedings of a conference on platelet function testing.* Editado por: Day HJ, Holmsen H, Zucker MB. pp 576-607. Philadelphia, EUA.1976.
161. **Karpatkin S.** Heterogeneity of human platelets. VI. Correlation of platelet function with platelet volume. *Blood.* 51(2):307-16. 1978.
162. **Kelton JG, Gibbons S.** Autoimmune platelet destruction: idiopathic thrombocytopenic purpura. *Semin Thromb Hemost.* 8(2):83-104. 1982.
163. **Khan I, Zucker-Franklin D, Karpatkin S.** Microthrombocytosis and platelet fragmentation associated with idiopathic / autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 31(4):449-60. 1975.

164. **Kiener JL, Cho Em Saba TM.** Factor XIII as a modulator of plasma fibronectin alterations during experimental bacteriemia. *J Trauma.* 26 (11): 1013-23. 1986.
165. **Kitchens CS, Weiss L.** Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood.* 46 (4): 567-78. 1975.
166. **Kitchens CS.** Amelioration of endothelial abnormalities by prednisone in experimental thrombocytopenia in the rabbit. *J Clin Invest.* 60: 1129–34. 1977.
167. **Kolde H J.** Haemostasis: Physiology, Pathology, Diagnostics. 2<sup>a</sup> edic. Pentapharm Ltd. Suiza. 2004.
168. **Kontos VI, Papadopoulos O, Frech TW.** Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet Clin Pathol.* 20:101-5. 1991.
169. **Kraytman M.** Platelet size in thrombocytopenias and thrombocytosis of various origin. *Blood.* 41(4): 587-98. 1973.
170. **Kristensen AT, Weiss DJ, Klausner JS, Laber J, Christie DJ.** Comparison of microscopic and flow cytometric detection of platelet antibody in dogs suspected of having immune-mediated thrombocytopenia. *Am J Vet Res.* 55(8):1111-4. 1994.
171. **Kuehn NF, Gaunt SD.** Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 186 (4): 355-8. 1985.
172. **Kumar S, Tamura K, Nei M.** MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-3. 2004.
173. **Kuter DJ.** Megacariopoyesis y trombopoyesis. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1<sup>a</sup> edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap. 110. p 1339. Madrid, España. 2005.
174. **Lago O, Szwarczer E.** Tiempo de lisis de euglobulinas. En: Manual de Hemostasia y Trombosis. Grupo CLAHT. Editado por: Kordich L, Sánchez J, Vidal H, De Campos

C. 1<sup>a</sup> edic. Imprenta de la Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. p 367. Argentina. 1990.

175. **Lai TH, Orellana NG, Yuasa Y, Rikihisa Y.** Cloning of the major outer membrane protein expression locus in *Anaplasma platys* and seroreactivity of a species-specific antigen. J Bacteriol. 193(12): 2924-30. 2011.

176. **Lang T, Johanning K, Metzler H, Piepenbrock S, Solomon C, Rahe-Meyer N, Tanaka KA.** The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia. Anesth Anal. 108: 751– 8. 2009.

177. **Lau CS, McLaren M, Beich JJF.** Factor VIII von Willebrand antigen levels with symptom severity in patients with Raynaud's phenomenon. Br J Rheumatol. 30: 433-6. 1991.

178. **Lemaster JJ, Hackenbrock CR.** Firefly Luciferase Assay for ATP production by mitochondria. En: Methods Enzymol. Vol. LVII. Editado por: De Luca M. Academic Press. Cap 4. pp 36-50. New York, EUA. 1978.

179. **Lemos ER, Rozental T, Mares-Guia MA, Almeida DN, Moreira N, Silva RG, Barreira JD, Lamas CC, et al.** Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. (1): 85-7. 2011.

180. **Lemos PP, Chen D, Bernstein AM, Bennett MK, Whiteheart SW.** Regulated secretion in platelet: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. Blood. 90:1490. 1997.

181. **Lerea KM, Glomset JA, Krebs EG.** Agents that elevate cAMP levels in platelets decrease thrombin binding. J Biol Chem. 262: 282-8. 1987.

182. **Levi M, de Jonge E, Meijers J.** The diagnosis of disseminated intravascular coagulation. Blood Rev. 16 (4): 217–23. 2002.

183. **Lewis DC, McVey DS, Shuman WS, Muller WB.** Development and characteriza-

tion of a flow cytometric assay for detection of platelet-bound immunoglobulin G in dogs. *Am J Vet Res.* 56(12):1555-8. 1995.

184. **Lewis JH.** *Comparative Hemostasis in vertebrates.* New York: Plenum Press. 426. 1996.

185. **Li YF, Spencer FA, Becker RC.** Comparative efficacy of fibrinogen and platelet supplementation on the *in vitro* reversibility of competitive glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIb/beta3) receptor-directed platelet inhibition. *Am Heart J.* 142: 204-10. 2001.

186. **Lijnen HR, Zamarron C, Babler M, Winkler ME, Collen D.** Activation of plasminogen by prourokinase. I. Mechanism. *J Biol Chem.* 261:1253-8. 1986.

187. **Lillini E, Macrí G, Proietti G, Scarpulla M.** New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci.* 1081:360-70. 2006.

188. **Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E.** Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost.* 6(4):677-83. 2008.

189. **Lippi G, Franchini M, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC.** Correlation between von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor ristocetin cofactor activity and factor VIII activity in plasma. *J Thromb Thrombol.* 26 (2):150-3. 2008.

190. **Loewy AG, Edsall JT.** Studies in the formation of urea insoluble fibrin. *J Biol Chem.* 211:829. 1954.

191. **Loretti AP, Barros SS.** Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet Parasitol.* 134 (3-4): 193-213. 2005.

192. **Lovering SL, Pierce KR, Adams LG.** Serum Complement and Blood Platelet Adhesiveness in Acute Canine Ehrlichiosis. *Am J Vet Res.* 41 (8): 1266-71. 1980.

193. **Lowe GD, Rumley A, Mackie IJ.** Plasma fibrinogen, *Ann Clin*

Biochem, 41 (6): 430-40. 2004.

194. **Lundin A.** Use of Firefly Luciferasa in ATP-Related Assays of Biomass, Enzymes, and Metabolites. En: *Methods in Enzymol.* Editado por: De Luca MA. Vol 305. Academic Press. Cap 25. pp 346-57. New York, EUA. 2000.

195. **Mannucci L, Redaelli R, Tremoli E.** Effects of aggregating agents and of blood cells on the aggregation of whole blood by impedance technique. *Thromb Res.* 52 (2): 143-51. 1988.

196. **Marbet GA, Griffith MJ.** Tissue thromboplastin induced reversible DIC and heparin-enhanced inhibitors in dogs. *Thromb Haemost.* 55 (1): 78-85. 1986.

197. **Marder VJ, Francis CW.** Physiologic Regulation of Fibrinolysis. En: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice.* Editado por: RW Colman, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 5ª edic. Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 23. pp 1-87. Philadelphia, EUA. 2006.

198. **Martin AR, Brown GK, Dunstan RH, Roberts TK.** *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp Paras.* 109: 176-80. 2005.

199. **Martínez C.** Proteína Z. TAFI y anexinas como proteínas reguladoras de la coagulación sanguínea. *Gac Méd Méx.* 138 (1): S-52-5. 2002.

200. **Mateo J, Santamaría A, Borrel, M, Souto JC, Fontcuberta J.** Fisiología y exploración de la hemostasia. En: *Hematología Clínica.* Editado por: Sans Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL. Harcourt. pp 597-618. Madrid, España. 2001.

201. **Mathew JS, Ewing SA, Murphy GL, Kocan KM, Corsvet RE, Fox JC.** Characterization of a new isolate of *Ehrlichia platys* (Order *Rickettsiales*) using electron microscopy and polymerase chain reaction. *Vet Parasitol.* 68:1-10. 1997.



202. **McCarroll DR, Waters DC, Steiley KR.** Canine platelet von Willebrand factor: quantification and multimeric analysis. *Exp hematol.* 16: 929-37. 1988.
203. **McGavin MD, Carlston WW, Zachary JF.** The hemopoietic system. *Thompson's Special Veterinary Pathology.* Editado por McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF. 3<sup>a</sup> edic. Mosby. Cap 7. p 355. Missouri. EUA. 2001.
204. **Meyers KM, Holsem H, Searchord CL.** Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol.* 243: R454 - 61. 1982.
205. **Meyers KM, Wardrop KJ, Helmick C, White F.** von Willebrand factor is present in the vascular endothelium from normal dogs and from Doberman pinscher dogs with a plasma von Willebrand factor deficiency. *Thromb Res.* 57 (1): 109-16. 1990.
206. **Meyers KM, Wardrop KJ, Meinkoth J.** Canine von Willebrand's Disease: Pathobiology, Diagnosis, and short-term treatment. *The Comp North Amer Edition Small Anim.* 14 (1): 13-22. 1992.
207. **Moritz A, Walcheck BK, Weiss D.** Flow cytometric detection of activated platelets in the dog. *Vet Clin. Pathol.* 32: 6-12. 2003.
208. **Morris DD, Messick J, Whitlock RH, Palmer J, Ward MV, Feldman BF.** Effect of equine ehrlichial colitis on the hemostatic system in ponies. *Am J Vet Res.* 49 (7):1030-6. 1988.
209. **Motoi Y, Satoh H, Inokuma H, Kiyuuna T, Muramatsu Y, Ueno H, Morita C.** First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol.* 45(1): 89-91. 2001.
210. **Mullis KB, Falaona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(1): 263-73. 1986.

211. **Mullis KB.** The unusual origin at the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 262 (4):56-61. 1990.
212. **Munderloh U, Lych M, Herron M, Palmer A, Kurtti T, Nelson RD, Goodman J.** Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol.* 101(1): 53-64. 2004.
213. **Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, Kontos VS.** Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 40:174-84. 2004.
214. **Mylonakis ME, Leontides L, Farmaki R, Kostoulas P, Koutinas AF, Christopher M.** Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and cumpling in healthy dogs. *J Vet Diag Invest.* 20: 774-9. 2008.
215. **Nachman RL, Rafii S.** Platelets, Petechiae, and Preservation of the Vascular Wall. *N Engl J Med.* 359 (12): 1261–70. 2008.
216. **Neefs JM, Van de Peer Y, De Rijk P, Goris A, De Wachter R.** Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 25(19): 1987-2015. 1991.
217. **Nelson OL, Andreasen C.** The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 17(6): 830-4. 2003.
218. **Nelson RW, Couto CG.** Disorders of hemostasis. En *Small Animal Internal Medicine.* 3<sup>a</sup> edic. Mosby. Cap 89. p 1185. Missouri, EUA. 2003.
219. **Nieswandt B, Watson S.** Platelet-collagen interaction is GPVI the central receptor?. *Blood.* 15 (102): 449-61. 2003.
220. **Norris LA.** Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obst Gyn.* 17(3): 369-83. 2003.

221. **Northern J, Tvedten HW.** Diagnosis of microthrombocytosis and immune-mediated thrombocytopenia in dogs with thrombocytopenia: 68 cases (1987-1989). *JAVMA* 200 (3): 368-76. 1992.
222. **Oviedo MA.** Relación entre la ehrlichiosis canina y el sistema de la coagulación sanguínea. Trabajo de Ascenso. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay (Aragua), Venezuela. p105. 2001.
223. **Pareti FI, Capitanio A, Mannucci L, Ponticelli C, Mannucci PM.** Acquired dysfunction due to the circulation of “exhausted” platelets. *Am J Med.* 69 (2): 235-40. 1980.
224. **Parise LV, Smyth SS, Coller BS.** Morfología, Bioquímica y Función de las Plaquetas. En: *Williams Hematología.* Editado por: Beutler E. Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic. Vol 2. Marbán Libros. Cap 111. pp 1357-408. Madrid, España. 2005.
225. **Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D.** Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94 (6): 707-8. 2000.
226. **Parola P, Cornet JP, Sanogo YO, Miller RS, Thien HVN, González JP, Raoult D, Telford SR III, Wongsichanalai C.** Detection of *Ehrlichia spp*, *Anaplasma spp.*, *Rickettsia spp.*, and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J Clin Microbiol.* 41: 1600-8. 2003.
227. **Parry BW.** Laboratory evaluation of Hemorrhagic Coagulopathies in Small Animal Practice. *Vet Clin North Amer Small Anim Practice.* 19 (4): 729-41. 1989.
228. **Patel JB.** 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn.* 6(4):313-21. 2001.

229. **Pedersen HD, Häggstrom J, Olsen LH.** Idiopathic a symptomatic thrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels is an autosomal recessive trait. *J Vet Intern Med.* 16 (2):169-73. 2002.
230. **Pennisi MG.** Infection of small ruminants with Ehrlichia spp. in Sicily. *Parassitologia.* 41(1): 85-8. 1999.
231. **Petersen L, Sawyer L, Fishbein D, Kelley P, Thomas R, Magnarelli L, Redus M, Dawson J.** An outbreak of ehrlichiosis in members of army Reserve Unit Exposed to ticks. *J Infect Dis.* 159 (3): 562-8. 1989.
232. **Pierce KR, Marrs G, Hightower D.** Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. *Am J Vet Res.* 38(11):1821-5. 1977.
233. **Proctor RR, Rapaport SI.** The Partial Thromboplastine with Kaolin. *Am J Clin Path.* 36: 211. 1961.
234. **Quick AJ.** The Prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. *J Biol Chem.* 109:73. 1935.
235. **Ramos F, Batlle J, López A.** Mecanismos de alteración funcional del factor von Willebrand. *Med Clin (Barc)* 92: 588-94. 1989.
236. **Rao AK, Kowalska MA, Karczewski J, Tuszynski GP.** Human antibody against an 88 kilodalton platelet membrane glycoprotein and impaired platelet response to collagen. *Circulation II:* 620. 1988a.
237. **Rao AK, Schapira M, Clements ML, Niewiarowski S, Budzynski AZ, Schmaier AH, Harpel PC, Blackwelder WC *et al.*** A prospective study of platelets and plasma proteolytic systems during the early stages of Rocky Mountain spotted fever. *N. Engl J Med.* 318:1021-8. 1988b.

238. **Rao AK.** Acquired Qualitative Platelet Defects En: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles & Clinical Practice. Editado por: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 5<sup>a</sup> edic. Lippincott Williams & Wilkins. Cap 70. p105. Philadelphia, EUA. 2006.
239. **Raskob GE, Russell D, Hull D, Graham FP.** Trombosis venosa. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E. Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1<sup>a</sup> edic. Vol 2. Marbán Libros. Cap 129. p1735. Madrid, España. 2005.
240. **Reardon MJ, Pierce KR.** Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs. Vet Pathol. 18(3): 384-95. 1981.
241. **Riess H, Braun G, Brehm G, Hiller E.** Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. Am J Clin Pathol. 85 (1): 50-6. 1986.
242. **Rikihisa Y.** The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev. 4 (3): 286-308. 1991.
243. **Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC, Siregar AG, Pasaribu FH, Malole MB.** Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. J Clin Microbiol. 30 (1): 143-8. 1992.
244. **Rikihisa Y.** New findings on members of the family *Anaplasmataceae* of veterinary importance. Ann N Y Acad Sci. 1078: 438-45. 2006.
245. **Roberts HR, Monroe DM, Hoffman M.** Biología molecular y bioquímica de los factores de coagulación y de las vías de hemostasia. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E. Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1<sup>a</sup> edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap 112. pp1409-34. Madrid, España. 2005.

246. **Rodicio M del R, Mendoza M del C.** Identification of bacteria through 16S rARN sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22 (4): 238-45. 2004.
247. **Rodríguez IP, Saldaña HA.** La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas décadas de su invención. *Ciencia UANL* 3 (VII): 323-35. 2004.
248. **Rogers CL, Rozanski EA.** Von Willebrand factor antigen concentration in dogs with sepsis. *J Vet Intern Med.* 24(1):229-30. 2010.
249. **Rokita H, Neta R, Sipe JD.** Increased fibrinogen synthesis in mice during the acute phase response: co-operative interaction of interleukin 1, interleukin 6, and interleukin 1 receptor antagonist. *Cytokine.* 5(5):454-8. 1993.
250. **Ruble RP, Cullor JS, Brooks DL.** The observation of the reactive thrombocytosis in New Zealand white rabbits in response to experimental *Pasteurella multocida* infection. *Blood Cells Mol Dis.* 25(2):95-102. 1999.
251. **Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E.** Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood.* 94:172-8. 1999.
252. **Sainz A, Tmusategui I, Tesouro MA.** *Ehrlichia platys* infection and diseases in dogs in Spain. *J Vet Diagn Invest.* 11:382-4. 1999.
253. **Sambrook J, Rusella DW.** *In vitro* Amplification of DNA by PCR. En: *Molecular Cloning web site: On line Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Lab. Pres. Cap.8. pp 8.18-8.24. New York, EUA. 2001.
254. **Sánchez JC, Kordich LC, Blanco AN.** Fibrinolisis: métodos de estudio. En: *Manual de hemostasia y Trombosis.* Grupo CLAHT. Editado por: Kordich L, Sánchez J, Vidal H, De Campos C. 1ª edic. Imprenta de la Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. Cap. 10. p 363. Argentina. 1990.

255. **Sanogo YO, Davoust B, Inokuma H, Camicas JL, Parola P, Brouqui P.** First evidence of *A. platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. Onderstepoort. J Vet Res.70 (3): 205-12. 2003.
256. **Savage B, Sixma JJ, Ruggeri ZM.** Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. Proc Natl Acad Sci. 99: 425-30. 2002.
257. **Schafer AI.** Trombocitosis y trombocitopenia idiopática. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E. Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap. 118. pp. 1541-9. Madrid, España. 2005.
258. **Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ.** Hematología Veterinaria. 1ª edic. Hemisferio Sur, S.A. 316p. Buenos Aires, Argentina. 1981.
259. **Schermerhorn T, Barr SC, Stoffregen DA, Koren-Roth Y, Erb HN.** Whole-blood platelet aggregation, buccal mucosa bleeding time, and serum cephalothin concentration in dogs receiving a presurgical antibiotic protocol. Am J Vet Res. 55(11):1602-7.1994.
260. **Seamer J, Snape T.** *Ehrlichia canis* and tropical canine pancytopenia. Res Vet Sci. 13: 307-14. 1972.
261. **Sedano MC, Florez J.** Farmacología de la Hemostasia, la Coagulación y la Fibrinólisis. En: Farmacología Humana. 3ª edic. Masson S.A. p 803-34. España. 2005.
262. **Seligsohn U.** Coagulación intravascular diseminada. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E. Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap. 126. p 1677. Madrid, España. 2005.
263. **Seligsohn U, Coller B.** Clasificación, manifestaciones clínicas y evaluación de los trastornos de la hemostasia. En Williams Hematología. Editado por: Beutler E. Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap. 115. pp 1471-7. Madrid, España. 2005.

264. **Seligsohn U, White GC.** Deficiencias hereditarias de los factores de la coagulación II, V, VII, XI y XIII y deficiencias combinadas de los factores V y VII y de los factores vitamina K-dependientes. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic. Vol 2. Marbán Libros. Cap 122. pp 1617-38. Madrid, España. 2005.
265. **Sellon RK.** Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33 (4): 677-93. 2003.
266. **Shatill SJ, Brass LF.** Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem.* 262: 992-1000. 1987.
267. **Shatill SJ, Kashiwagi H, Pampori N.** Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 91: 2645-57. 1998.
268. **Shatill SJ, Abrams CS, Bennett JS.** Trastornos plaquetarios cualitativos adquiridos debido a enfermedades, fármacos y alimentos. En: Williams Hematología. Editado por: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. 1ª edic. Vol. 2. Marbán Libros. Cap 120. p 1583. Madrid, España. 2005.
269. **Siarkou VI, Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF.** Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Vet Microbiol.* 125 (3-4): 304-12. 2007.
270. **Silverman DJ.** Adherence of platelet to human endotelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*. *J Infect Dis.* 153 (4): 694-700. 1986.
271. **Simpson CF.** Structure of *Ehrlichia canis* in blood monocytes of a dog. *Am J Vet Res.* 33 (12): 2451-4. 1972.
272. **Simpson RM, Gaunt SD, Hair JA, Kocan KM, Henk WG, Casey HW.** Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res.* 52 (9): 1537-41. 1991.



273. **Smith RD, Ristic M, Huxoll DL, Baylor RA.** Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. *Infect Immun.* 11 (6):1216-21. 1975.
274. **Sodikoff CH.** Laboratory Profiles of Small Animal Diseases. A guide to laboratory diagnosis. Mosby. 2<sup>a</sup> edic. pp. 1537- 40. St. Louis (MO), EUA. 1995.
275. **Southern D, Leclair S.** Diagnostic haematology. WB. Saunders Company. pp. 483-547. Philadelphia, EUA. 1995.
276. **Sparagano OA, de Vos AP, Paoletti B, Camma C, de Santis P, Otranto D, Giangaspero A.** Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *J Vet Diagn Invest.* 15: 527–34. 2003.
277. **Sporn LA, Shi RJ, Lawrence SO, Silverman DJ, Marder VJ.** *Rickettsia rickettsii* infection of cultured endothelial cells induces release of large vWF multímeros from waibel-Palade bodies. *Blood.* 78: 2595. 1991.
278. **Stokol T.** Plasma D- dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33(6):1419-35. 2003.
279. **Strumia MM, Samples AB, Hart ED.** An improved Microhematocrit Method. *Am J Clin Path.* 24: 1016. 1954.
280. **Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S.** A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood.* 69: 1712–20. 1987.
281. **Suksawat J, Pitulle C, Arraga-Alvarado C, Madrigal K, Hancock SI, Breitschwerdt EB.** Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on considerations of 16S Ribosomal DNA secondary structure. *J Clin Microbiol.* 39: 90-3. 2001.

282. **Sundberg RD.** Lymphocytes: origin, structure, and interrelationships. En *The lymphocyte and lymphocytic tissue*. Editado por: JW Rebeck, Paul B, Hoeber. Inc. p 1. New York, EUA. 1960.
283. **Sweeney JD, Labuzetta J W, Fitzpatrick JE.** The effect of the platelet count on the aggregation response and adenosine triphosphate release in an impedance Lumi-aggregometer. *Am J Clin Pathol.* 89: 655-9. 1988.
284. **Szatkowski NS, Kunicki TJ, Aster RH.** Identification of glycoprotein Ib as a target for autoantibody in idiopathic (autoimmune) thrombocytopenic purpura. *Blood.* 67 (2): 310-5. 1986.
285. **Tami I, Martínez I, Tami M, Redondo MC, Finol H, Simonovis N.** Identification of *Ehrlichia* species in blood smear. *Infect Dis In Clin Pract.* 5 (9): 555-7. 1996.
286. **Tami I, Jordan L.** Identificación de mórulas de *Ehrlichia* en plaquetas de sangre humana en Venezuela. *Antibiótico e Infección.* 10(3):1328. 2002.
287. **Tarnow I, Kristensen AT, Olsen LH, Pedersen HD.** Assessment of changes in hemostatic markers in cavalier King Charles Spaniels with myxomatous mitral valve disease. *Am J Vet Res.* 65:1644-52. 2004.
288. **Taylor FB Jr.** Response of anticoagulant pathways in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost.* 27(6):619–31. 2001.
289. **Taylor SS.** cAMP-dependent protein kinase. Model for an enzyme family. *J Biol Chem.* 264 (15): 8443-6. 1989.
290. **Terrazzano G, Cortese L, Piantedosi D, Zappacosta S, Di Loria A, Santoro D, Ruggiero G, Ciaramella P.** Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 110 (3-4): 331-7. 2006.

291. **Thomas JS.** Von Willebrand's Disease in the Dog and Cat. *Vet Clin North Amer: Small Anim Pract.* 36 (5): 1089-110. 1996.
292. **Thomas JS.** Overview of plasma proteins. En: *Schalm's Veterinary Hematology.* Editado por: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Blackwell Publis. Profess. Capm. Cap 134. pp 890. Philadelphia, EUA. 2006.
293. **Thompson CB, Jakubowski JA, Quinn PG, Deykin D, Valeri CR.** Platelet size as a determinant of platelet function. *J Lab Clin Med.* 101(2): 205-13. 1983.
294. **Thorsen S, Glas-Greenwalt P, Astrup T.** Differences in the binding to fibrin of urokinase and tissue plasminogen activator. *Thromb Diath Haemorrh.* 28: 65-74. 1972.
295. **Troy GC, Forrester SD.** Canine ehrlichiosis: *Ehrlichia canis*, *E. Equi* y *E. Risticii* infections. En: *Infectious diseases of the dog and cat.* Editado por: Greene WB. WB Saunders Co. p 404- 14. Philadelphia. EUA. 1990.
296. **Tuddenham ECD, Lazarchick J, Hoyer LW.** Synthesis and release of Factor VIII by cultured endothelial cells. *Br J Haematol.* 47: 617-26. 1981.
297. **Uff S, Clemetson JM, Harrison T, Clemetson KJ, Emsley J.** Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib (alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. *J Biol Chem.* 277(38): 35657-63. 2002.
298. **Ulutas B, Nayramli G, Karagenc T.** First Case of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* infection in a dog in Turkey. 2007.
299. **Van Horn DL, Johnson SA.** The Mecanism of Thrombocytopenic Bleeding. *Amer J Clin Pathol.* 46 (2): 204-12. 1966.
300. **Vicente V, Alberca I, Ruiz R, Herrero I, González R, Portugal J.** Coagulation abnormalities in patients with mediterranean spotted fever. *J infect Dis.* 153: 128-31. 1986.

301. **Von Kaulla KN, Schultz R.** Comparative studies for evaluating fibrinolysis: studies with two combined techniques. *Am J Clin Pathol.* 29: 104-9. 1985.
302. **Vu TK, Nakata H, De Marinis RM.** Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 64:1057-68. 1991.
303. **Wagner DD, Mayadas T, Marder VJ.** Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. *J Cell Biol.* 102: 1320-4. 1986.
304. **Walker DH, Dumler JS.** Emergence of the Ehrlichioses as human health problems. *Synopses 2 (1):* 18-29.1996.
305. **Waner T, Harrus S, Weiss D, Bark H, Keysary A.** Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Imm Pathol.* 48: 177-82. 1995.
306. **Waner T, Leykin I, Shinitsky M, Sharabani E, Buch H, Keysary A, Bark H, Harrus S.** Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs, after artificial infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Imm Pathol.* 77: 145-50. 2000.
307. **Warner CK, Dawson JE.** Genus and species level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. En: PCR protocols for emerging infectious diseases. Part I. Editado por: D.H. Persing. Library of Congress. pp 100-5. Washington DC, EUA. 1996.
308. **Watson SP, McConnell RT, Lapetina EG.** The rapid formation of inositol phosphates in human platelets by thrombin is inhibited by prostacyclin. *J Biol Chem.* 259: 13199-203. 1984.
309. **Weiss HJ.** Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *New Engl J Med.* 293: 531-41 y 580-8. 1975.

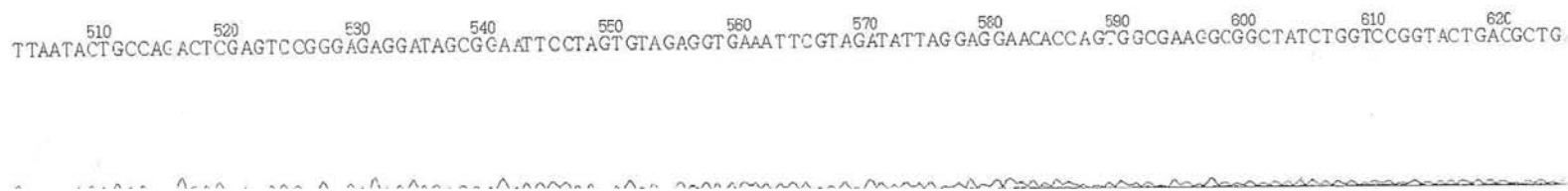
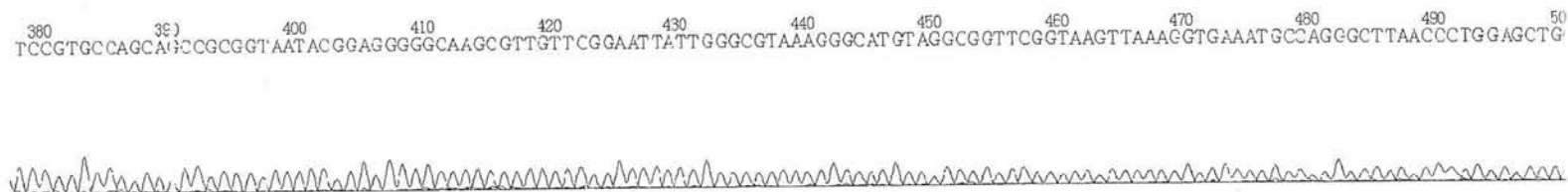
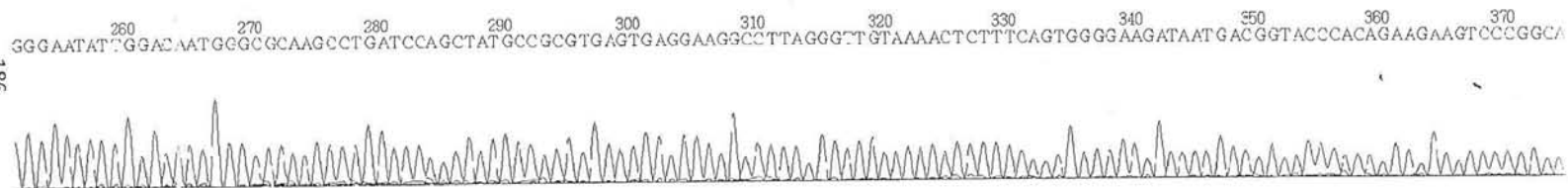
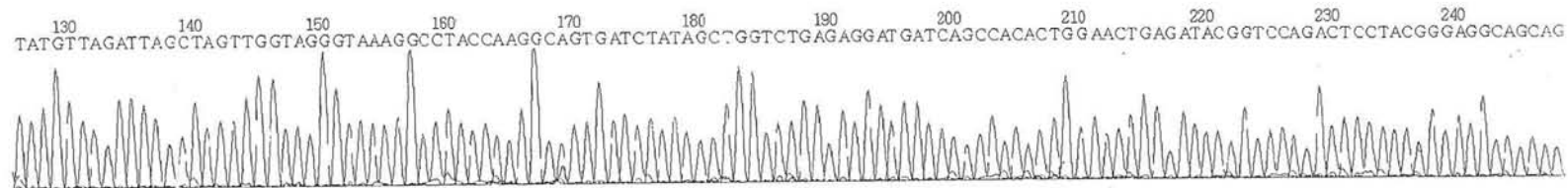
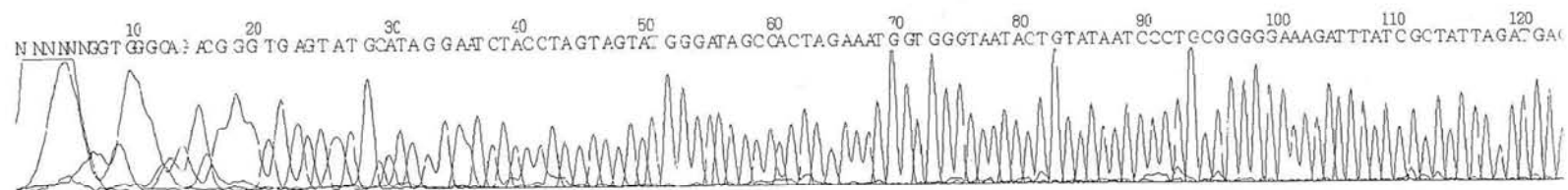
310. **Wen B, Rikihisa Y, Mott JM.** Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol.* 35 (7): 1852-5. 1997.
311. **White JG, Rao GH.** Microtubule coils *versus* the surface membrane cytoesqueleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol.* 152: 597-609. 1998.
312. **Wilkerson MJ, Shuman W, Swist SK, Meinkoth J, Kocan AA.** Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *Vet Clin Pathol.* 30 (3):141-9. 2001.
313. **Willis SE, Jackson ML, Meric SM, Rousseaux CG.** Whole blood platelet aggregation in dogs with liver disease. *Am J Vet Res.* 50 (11): 1893-7. 1989.
314. **Wilson JF.** *Ehrlichia platys* in a Michigan Dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 28: 381-3. 1992.
315. **Wong SJ, Thomas JA.** Citoplasmic, Nuclear, and Platelet Autoantibodies in Human Granulocytic Ehrlichiosis Patients. *J Clin Microb.* 36 (7): 1959-63. 1998.
316. **Wong SY.** Colorimetric Determination of Iron and Hemoglobin in blood. *J Biol Chem.* 77: 409. 1928.
317. **Woods VL Jr, Oh EH, Mason D, McMillan R.** Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood.* 63: 368-75. 1984.
318. **Woody BJ.** Clinicopathological findings in 135 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. Presented at the Workshop on Diseases caused by leucocytic *Rickettsiae* of man and animals. Champaign Urbana. IL, University of Illinois. 1985.
319. **Woody BJ, Hoskins JD.** Ehrlichial Diseases of Dog. *Ticks Transmitted Diseases.* *Vet. Clin. North Am Small Anim Pract.* 21(1):75-98. 1991.

320. **Yabsley MJ, Mckibben J, Macpherson CN, Cattan PF, Cherry NA, Hegarty BC, Breitschwerdt EB, O'Connor T *et al.*** Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia spp.* in dogs from Granada. *Vet Parasitol.* 151: 279-85. 2008.
321. **Yu XJ, Zhang XF, McBride JW, Zhang Y, Walker DH.** Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia platys* to other *Ehrlichia* species determined by *groESL* aminoacid sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:1143-6. 2001.
322. **Zondag ACP, Kolb AM, Bax NMA.** Normal values of coagulation in canine blood. *Haemostasis* 15: 318-23. 1985.

**Anexo 1.**

**Resultados de la secuenciación del ADNr 16S de *A. platys* Maracay aislado de la sangre de un perro Beagle infectado experimentalmente con una cepa de esta rickettsia obtenida en la Ciudad de Maracay (Aragua)**

File: 5-A.ab1 Run Ended: 2008/10/19 8:57:16 Signal G:463 A:366 C:193 T:428  
Sample: 5\_A Lane: 19 Base spacing: 15.706166 701 bases in 8366 scans Page 1 of 2

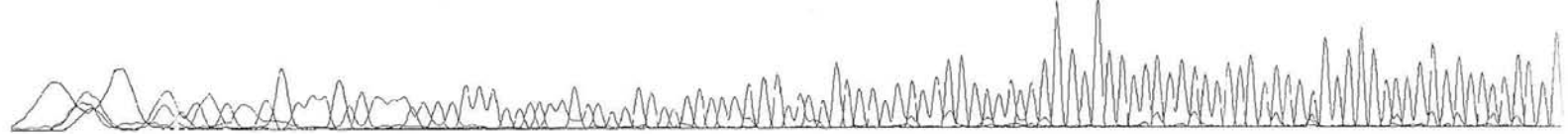




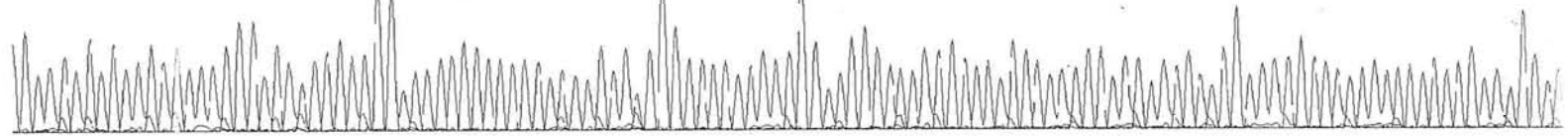
File: 5-A.ab1 Run Ended: 2008/10/19 8:57:16 Signal G:463 A:366 C:193 T:428  
Sample: 5\_A Lane: 19 Base spacing: 15.706166 701 bases in 8366 scans Page 2 of 2

630 640 650 660 670 680 690 700  
TGCGAAA GCGT GG 3GAGCA A/CAGGATTANATACCCC G GTACTCCA CECTG CAAACCATGAACTGC TAAA CN C

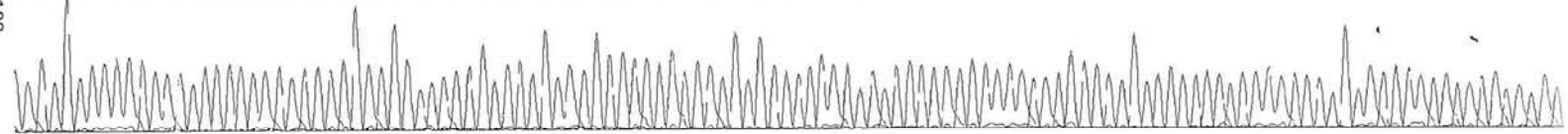
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
N NGGAN G C N I C I N A T O C T G T T T G C T C C A C G C T T T C G C A C C T C A G C G T C A G T A C C G G A C C A G A T A G C C G C C T T C G C C A C T G G T G T T C C T C C T A A T A T C T A C G A A T T T C A C T C T A C A C T A G C



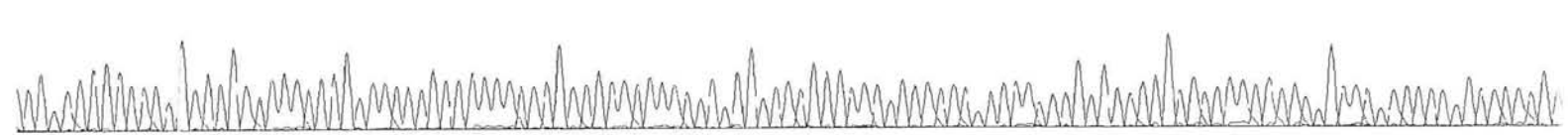
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250  
T T C C G C T A T C C T C T C C C G G A C T C G A G T C T G G C A G T A T T A A A A G C A G C T C C A G G G T T A A G C C C T G G C A T T C A C C T T T A A C T T A C C G A A C C G C C T A C A T G C C C T T T A C G C C C A A T A A T T C C G A A C



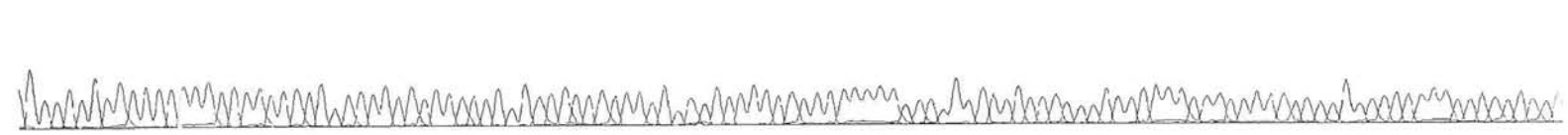
188  
260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370  
G C T T G C C C C C T C C S T A T T A C C G C G G C T G C T G G C A C G G A G T T T G C C G G G A C T T C T C T G T G G G T A C C G T C A T T A T C T T C C C C A C T G A A A G A G T T T T A C A A C C C T A A G G C C T T C C T C A C T C A C G C C



380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
A T A G C T G G A T C A G S C T T G C G C C C A T T G T C C A A T A T T C C C C A C T G C T G C C T C C C G T A G G A G T C T G G A C C G T A T C T C A G T T C C A G T G T G G C T G A T C A T C C T C T C A G A C C A G C T A T A G A T C A C T G C



510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620  
T G T A G G C C T T T A C C C T A C C A A C T A G C T A A T C T A A C A T A G G C T C A T C T A A T A G C G A T A A A C T T T C C C C G C A G G G A T A T A C A G T A T T A C C C A C C A T T C T A G T G C T A T C C C A T A C T A C T



File: 5-B.ab1 Run Ended: 2008/10/19 8:57:16 Signal G:563 A:463 C:416 T:822  
Sample: 5\_B Lane: 17 Base spacing: 15.859761 695 bases in 8301 scans Page 2 of 2

330 340 650 660 670 680 690  
TAGATTCCCTATGCATTACTCACCCCGTCTGCCACTAATTTTATCATAGCAAGCTACACCAAAAAATC



**Anexo 2.**

**Comparación de la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *A. platys* Maracay con las secuencias parciales del gen ARNr 16S de *A. platys* Venezuela y *A. platys* Lara**

Comparación de las secuencias parciales del ADNr 16S de tres cepas venezolanas de *A. platys*

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	10 20 30 40 50
Maracay	TGCATAGGAA TCTACCTAGT AGTATGGGAT AGCCACTAGA AATGGTGGGT
Venezuela	TGCATAGGAA TCTACCTAGT AGTATGGGAT AGCCACTAGA AATGGTGGGT
Lara	TGCATAGGAA TCTACCTAGT AGTATGGGAT AGCCACTAGA AATGGTGGGT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	60 70 80 90 100
Maracay	AATACTGTAT AATCCCTGCG GGGGAAAGAT TTATCGCTAT TAGATGAGCC
Venezuela	AATACTGTAT AATCCCTGCG GGGGAAAGAT TTATCGCTAT TAGATGAGCC
Lara	AATACTGTAT AATCCCTGCG GGGGAAAGAT TTATCGCTAT TAGATGAGCC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	110 120 130 140 150
Maracay	TATGTTAGAT TAGCTAGTTG GTAGGGTAAA GGCCTACCAA GGCAGTGATC
Venezuela	TATGTTAGAT TAGCCAGTTG GTAGGGTAAA GGCCTACCAA GGCAGTGATC
Lara	TATGTTAGAT TAGCTAGTTG GTAGGGTAAA GGCCTACCAA GGCAGTGATC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	160 170 180 190 200
Maracay	TATAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC ACTGGAAGT AGATACGGTC
Venezuela	TATAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC ACTGGAAGT AGATACGGTC
Lara	TATAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC ACTGGAAGT AGATACGGTC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	210 220 230 240 250
Maracay	CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAAG
Venezuela	CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAAG
Lara	CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAAG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	260 270 280 290 300
Maracay	CCTGATCCAG CTATGCCGCG TGAGTGAGGA AGGCCTTAGG GTTGTAATAAC
Venezuela	CCTGATCCAG CTATGCCGCG TGAGTGAGGA AGGCCTTAGG GTTGTAATAAC
Lara	CCTGATCCAG CTATGCCGCG TGAGTGAGGA AGGCCTTAGG GTTGTAATAAC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	310 320 330 340 350
Maracay	TCTTTCAGTG GGGAAAGATAA TGACGGTACC CACAGAAGAA GTCCCGGCAA
Venezuela	TCTTTCAGTG GGGAAAGATAA TGACGGTACC CACAGAAGAA GTCCCGGCAA
Lara	TCTTTCAGTG GGGAAAGATAA TGACGGTACC CACAGAAGAA GTCCCGGCAA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	360 370 380 390 400
Maracay	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGGGGCAAGC GTTGTTCGGA
Venezuela	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGGGGCAAGC GTTGTTCGGA
Lara	ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGGGGCAAGC GTTGTTCGGA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	410 420 430 440 450
Maracay	ATTATTGGGC GTAAAGGGCA TGTAGGCGGT TCGGTAAGTT AAAGGTGAAA
Venezuela	ATTATTGGGC GTAAAGGGCA TGTAGGCGGT TCGGTAAGTT AAAGGTGAAA
Lara	ATTATTGGGC GTAAAGGGCA TGTAGGCGGT TCGGTAAGTT AAAGGTGAAA

Continuación de la comparación de las secuencias parciales  
del ADN 16s de tres cepas venezolanas de *a. platys*

	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	460      470      480      490      500
Maracay	TGCCAGGGCT TAACCCTGGA GCTGCTTTTA ATACTGCCAG ACTCGAGTCC
Venezuela	TGCCAGGGCT TAACCCTGGA GCTGCTTTTA ATACTGCCAG ACTCGAGTCC
Lara	TGCCAGGGCT TAACCCTGGA GCTGCTTTTA ATACTGCCAG ACTCGAGTCC
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	510      520      530      540      550
Maracay	GGGAGAGGAT AGCGGAATTC CTAGTGTAGA GGTGAAATTC GTAGATATTA
Venezuela	GGGAGAGGAT AGCGGAATTC CTAGTGTAGA GGTGAAATTC GTAGATATTA
Lara	GGGAGAGGAT AGCGGAATTC CTAGTGTAGA GGTGAAATTC GTAGATATTA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	560      570      580      590      600
Maracay	GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGGCTATC TGGTCCGGTA CTGACGCTGA
Venezuela	GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGGCTATC TGGTCCGGTA CTGACGCTGA
Lara	GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGGCTATC TGGTCCGGTA CTGACGCTGA
	.... ....  .... .
	610
Maracay	GGTGCGAAAAG CGTGGG
Venezuela	GGTGCGAAAAG CGTGGG
Lara	GGTGCGAAAAG CGTGGG

**FINALIZACION DE LA TESIS DCOTORAL**

POSTGRADO DE MEDICINA VETERINARIA - UCV

OCTUBRE DE 2011

AUTORA: Lic. Esp. MILEDYS APOLONIA OVIEDO SOSA

TUTORA: Dra. GUADALUPE PILAR BALDIZÁN