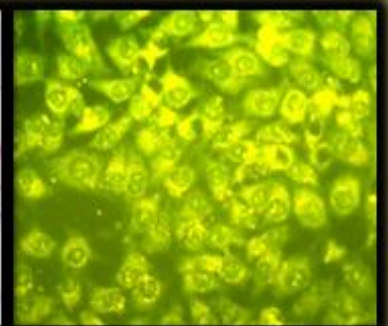
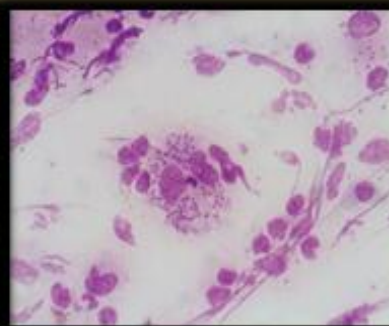




**IMPORTANCIA DE LOS
ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN LA
PATOGENIA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA**

MARÍA SOLEDAD CAMACHO QUESADA

CÓRDOBA, 2012



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

TÍTULO: *Importancia de los anticuerpos antinucleares en la patogenia de la leishmaniosis canina*

AUTOR: *María Soledad Camacho Quesada*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

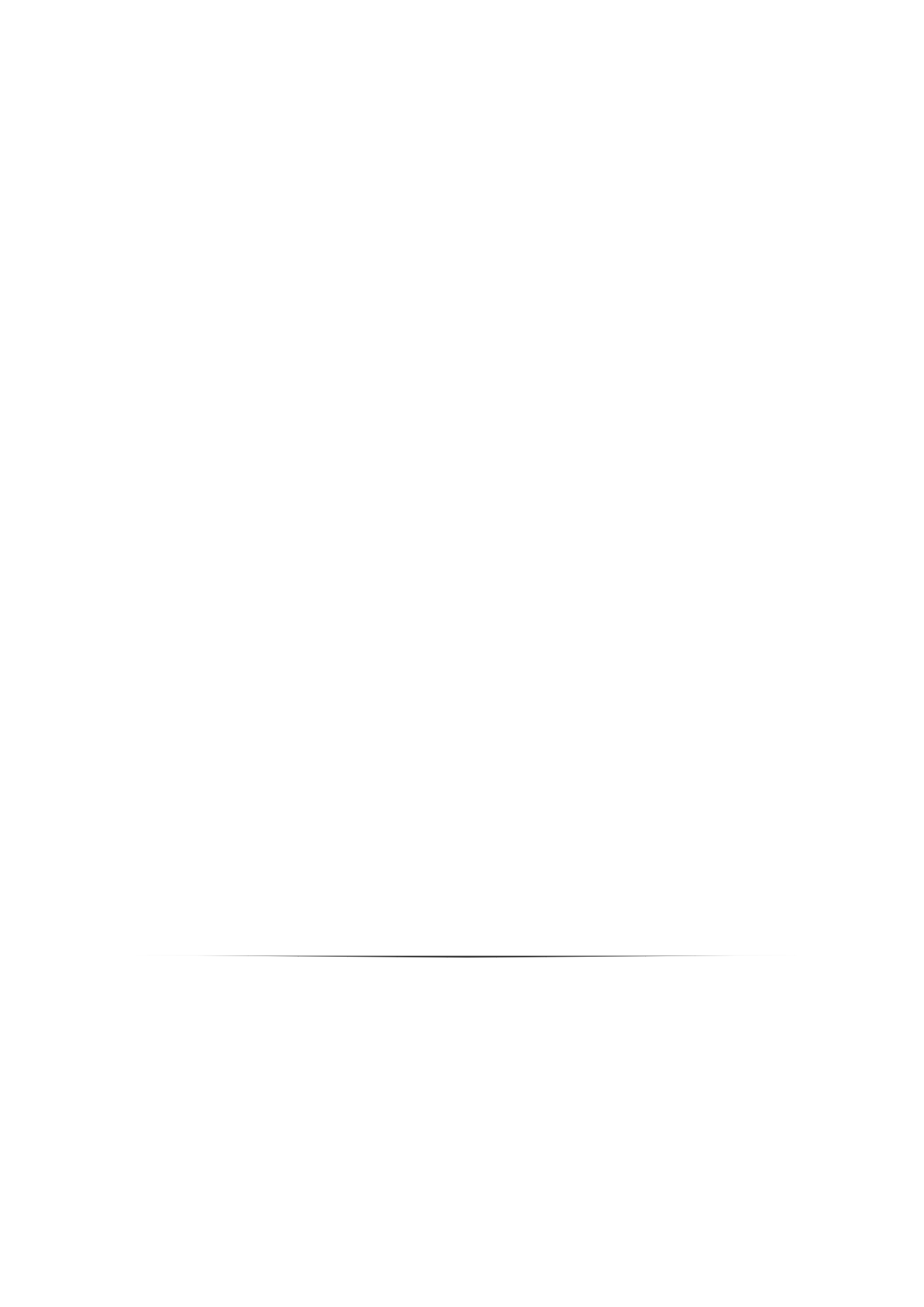
IMPORTANCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN LA PATOGENIA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR LA LICENCIADA EN
VETERINARIA **D^a MARÍA SOLEDAD CAMACHO QUESADA** PARA
ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR

CÓRDOBA, 2012

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGIA ANIMAL**





INFORME DE LOS DIRECTORES



TÍTULO DE LA TESIS: **IMPORTANCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN LA PATOGENIA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA**

DOCTORANDO/A: **D^a M^a SOLEDAD CAMACHO QUESADA**

La tesis doctoral ha sido realizada en el Dpto. de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de Córdoba, bajo nuestra dirección personal. Una vez concluida su redacción, ha sido supervisada y, merece, a juicio del abajo firmante, ser presentada para su mantenimiento y defensa pública ante el tribunal correspondiente. El interés de esta Tesis lo justifican los trabajos publicados:

. *Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis*. Research in Veterinary Science 2008;85(3):510-514.

. *Valoración de técnicas de inmunofluorescencia indirecta e inmunodifusión para la determinación de anticuerpos antinucleares en perros con leishmaniosis*. Revista electrónica de clínica veterinaria RecVet 2008;3(5):1-11 (<http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n050508.html>).

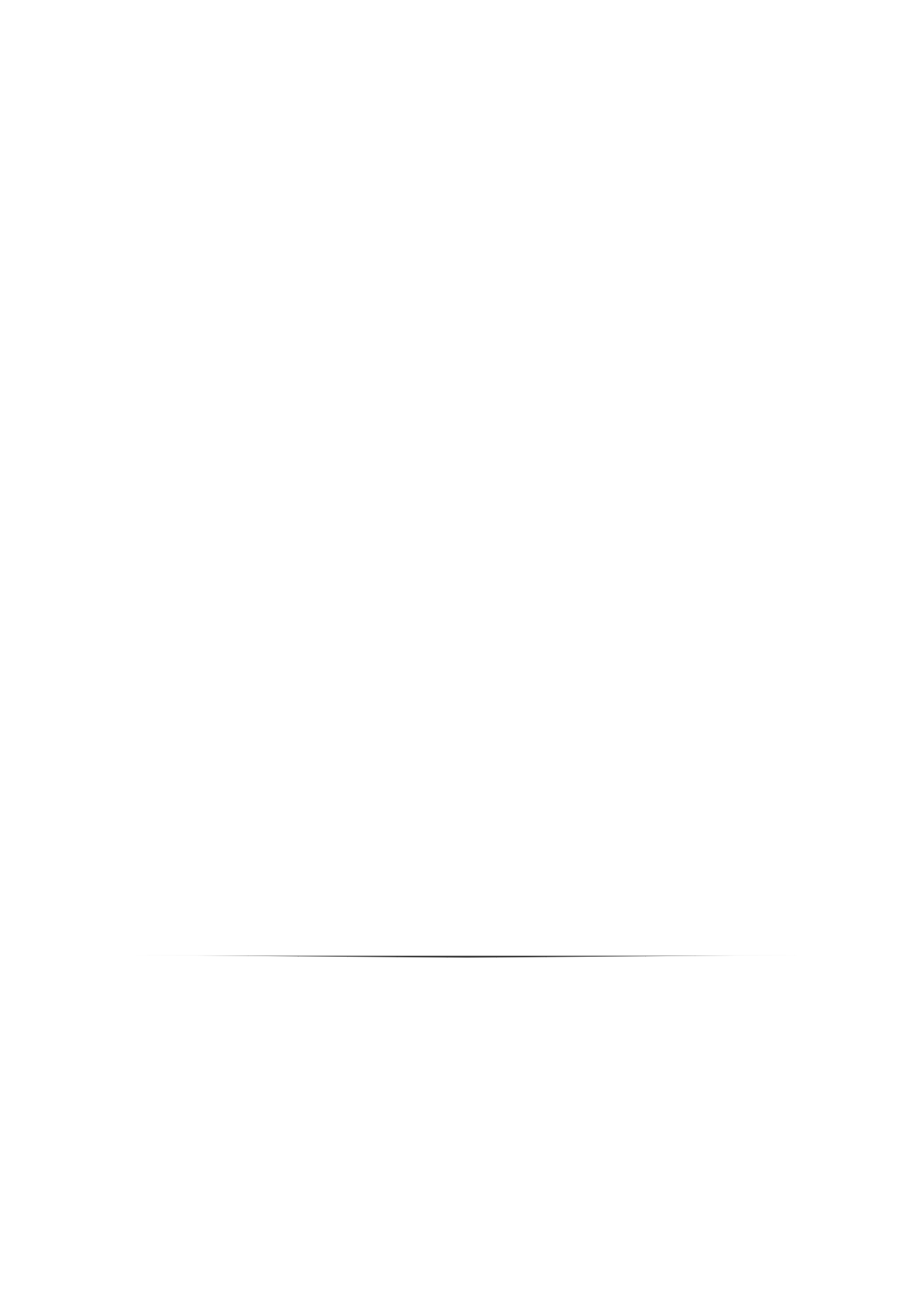
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, ____ de Diciembre de 2011

Firma del/de los director/es

Fdo. Pedro J. Ginel Pérez

Fdo.: Rosario Lucena Solís



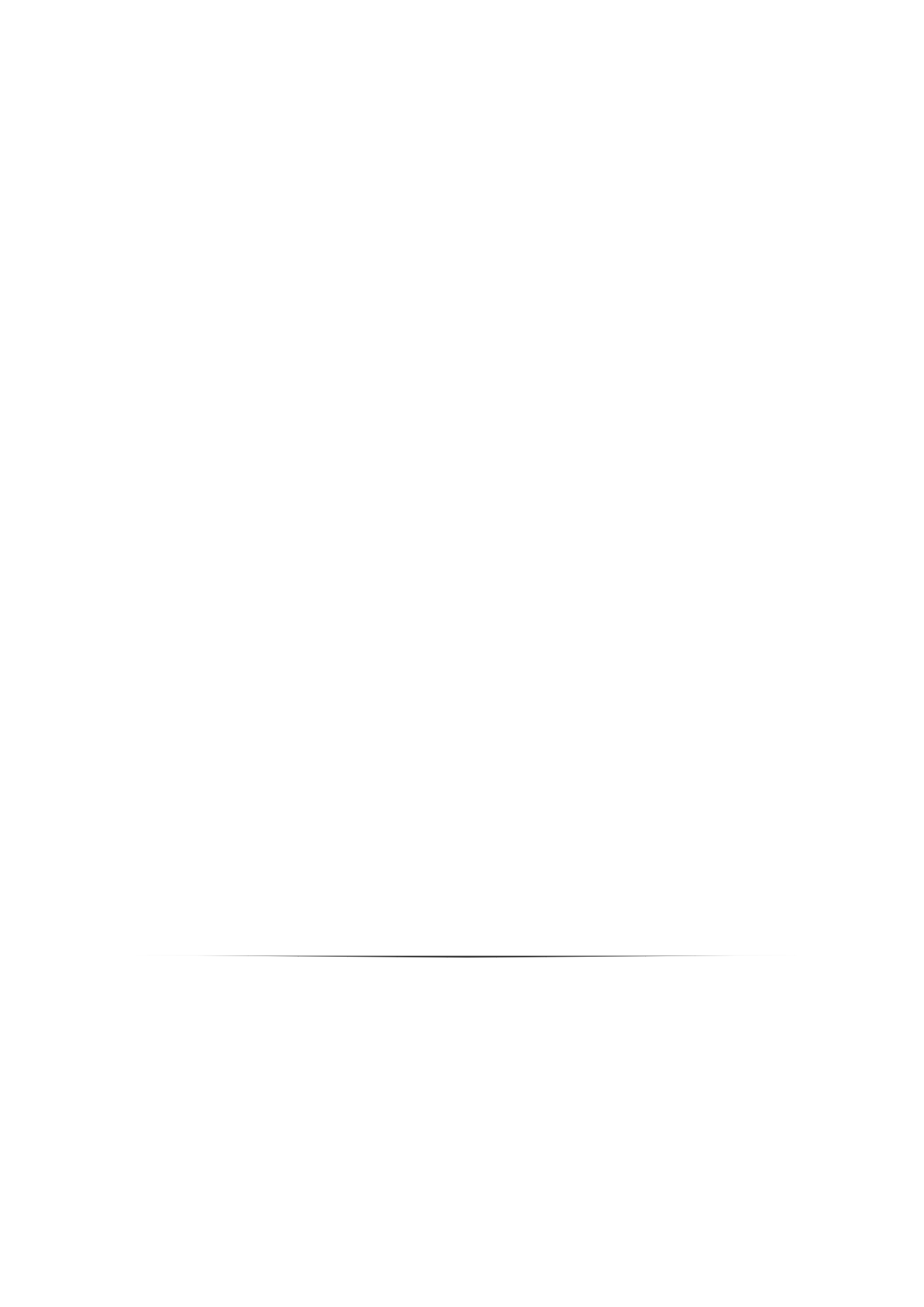
ÍNDICE

Introducción.....	1
. Objetivos.....	4
Revisión bibliográfica.....	7
Anticuerpos antinucleares (ANA).....	8
. Introducción.....	8
. Origen y producción de los ANA.....	10
. Mecanismos de acción patogénica.....	15
. Técnicas de determinación.....	20
- Inmunofluorescencia indirecta.....	20
- Inmunodifusión y contrainmunolectroforesis.....	27
- ELISA.....	30
. Especificidad antigénica.....	36
- Anticuerpos antinucleares frente a ADN.....	34
- Anticuerpos antinucleares frente a ENA.....	35
- Anticuerpos antinucleares frente a histonas.....	37
. Isotipos de ANA.....	38
. Interpretación clínica de los ANA.....	41
. Título.....	41
. Patrones de inmunofluorescencia.....	43

Leishmaniosis canina.....	49
. Etiología y patogenia.....	50
. Respuesta inmune.....	55
. Síntomas generales.....	61
. Alteraciones renales.....	71
. Diagnóstico.....	77
- Pruebas serológicas.....	78
- Citología.....	81
- PCR.....	82
- Reacción intradérmica.....	83
Fenómenos inmunopatológicos de la leishmaniosis canina.....	84
. Complejos inmunes circulantes.....	84
. Anticuerpos antinucleares.....	91
. Autoinmunidad.....	98
Material y Métodos.....	103
. Prevalencia de ANA en la leishmaniosis canina.....	104
- Inmunofluorescencia sobre hígado de rata.....	109
- Inmunofluorescencia sobre células Hep 2.....	113
. Isotipos de los ANA en la leishmaniosis canina.....	115
. Especificidad antigénica de los ANA en la leishmaniosis canina....	115
- ADN de doble cadena: Inmunofluorescencia sobre <i>Crithidia</i>	115
- ENA: técnica de doble inmunodifusión o de Ouchterlony.....	118
- Determinación de ANA frente a histonas: ELISA.....	121

. Correlación niveles séricos de Ac anti-histonas y glomerulonefritis	129
. Análisis estadístico.....	132
Resultados.....	133
. Prevalencia de ANA en la leishmaniosis canina.....	134
- Determinación de ANA en criocortes de hígado de rata.....	134
- Determinación de ANA en células Hep-2.....	135
- Correlación entre las técnicas de Inmunofluorescencia.....	138
. Isotipos de ANA en la leishmaniosis canina.....	139
. Relación entre isotipos de ANA y hallazgos clínicos.....	141
. Especificidad antigénica de los ANA en la leishmaniosis canina...	142
- Determinación de ANA anti ADN de doble cadena.....	142
- Determinación de ANA frente a ENA.....	144
- Determinación de ANA frente a histonas.....	146
. Correlación entre anticuerpos anti-histonas y glomerulonefritis.....	149
Discusión.....	161
. Prevalencia de ANA.....	164
. Patrones de inmunofluorescencia.....	171
. Correlación entre las técnicas de inmunofluorescencia.....	177
. Isotipos de ANA.....	182
. Especificidad antigénica.....	185
. Determinación de la especificidad antigénica.....	187
- ADN de doble cadena.....	187

- Anticuerpos frente a ENA.....	191
- Histonas.....	193
. Correlación entre anticuerpos anti-histonas y glomerulonefritis...	195
Conclusiones.....	205
Resumen.....	209
Summary.....	215
Referencias.....	221



INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis canina es una enfermedad parasitaria endémica en toda el área mediterránea. Su prevalencia en el perro es elevada, encuestas serológicas revelan que entre el 50 y 60% de todos los perros son seropositivos aunque sin síntomas (Nieto, 2005). El curso clínico se caracteriza por su carácter crónico y por la gran variedad de síntomas que puede provocar. Parte de este pleomorfismo clínico puede atribuirse a los fenómenos inmunopatológicos que el parásito desencadena en los perros donde la respuesta inmune no es protectora. En estos animales hay una respuesta policlonal de los linfocitos B con hipergammaglobulinemia, incremento de los complejos inmunes circulantes (CIC) y de los anticuerpos antinucleares (ANA). La presencia de CIC o hipersensibilidad de tipo III influye directamente en el curso de la enfermedad y también sobre la respuesta defensiva del animal al tener un efecto inmunosupresor. Afectan a la capacidad fagocítica de los polimorfonucleares neutrófilos y monocitos, a la agregación plaquetaria, liberación de aminas vasoactivas, etc. (Slappendel, 1988; Pinelli et al., 1995).

Muchos de los síntomas clínicos asociados con el depósito de CIC en enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (LES), están presentes en la leishmaniosis canina y muchas veces son los más relevantes clínicamente. El glomérulo renal, la úvea, las membranas sinoviales y la piel se consideran los órganos diana en las reacciones de hipersensibilidad tipo III o por inmunocomplejos (Day, 1998) y son precisamente los más afectados en la leishmaniosis

canina. También se ha registrado una asociación entre leishmaniosis canina y enfermedades inmunomediadas como el pénfigo foliáceo (Ginel et al., 1993). Explicar la patogenia de esta enfermedad requiere estudiar tanto la interacción del parásito con el sistema inmune del hospedador, como las consecuencias inmunopatológicas que se desencadenan en los perros que desarrollan la enfermedad.

Una parte de los CIC presentes en la leishmaniosis canina está constituida por ANA. El término de anticuerpo antinuclear se usa de forma genérica para describir auto-anticuerpos frente a diferentes componentes del núcleo celular como el ADN, el ARN y proteínas nucleares como las histonas (Tan, 1983). Los ANA son un fenómeno inespecífico y están presentes en numerosas enfermedades inflamatorias e infecciosas pero contribuyen al depósito vascular de CIC y parecen ser especialmente importantes en el desarrollo de lesiones glomerulares (Hahn, 1998). La incidencia de concentraciones elevadas de ANA en perros con leishmaniosis ya ha sido determinada (Lucena et al., 1996; Lucena y Ginel, 1998) pero nunca se ha establecido la especificidad antigénica de estos ANA ni se ha estudiado su correlación con procesos inmunopatológicos graves para el animal como las glomerulonefritis.

Objetivos

1) Establecer la prevalencia de títulos positivos de ANA en una población amplia de perros con leishmaniosis adquirida de forma natural y empleando dos técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con substratos diferentes: hígado de rata y células Hep-2. Se han estudiado muestras de más de 60 animales y establecido la correlación entre ambas técnicas.

2) Determinar los isotipos de inmunoglobulinas que forman los ANA en perros con leishmaniosis. Para ello se introdujo un paso adicional en la técnica de IFI empleando antisueros específicos para IgG, IgM e IgA caninas.

3) Investigar la especificidad antigénica de los ANA presentes en la leishmaniosis canina. En concreto pretendemos investigar la presencia de ANA frente a ADN de doble cadena, antígenos nucleares solubles o extraíbles (en inglés extractable nuclear antigens; ENA) y especialmente frente a histonas donde se desarrolló una técnica ELISA específica para histonas y se analizaron muestras de 93 perros con leishmaniosis.

4) Finalmente, pretendemos estudiar la asociación entre los ANA anti-histonas y el desarrollo de insuficiencia renal y glomerulonefritis. Con este objetivo se formaron con carácter

prospectivo dos grupos de perros con leishmaniosis: perros sin signos de glomerulonefritis y perros con signos de glomerulonefritis, basando el diagnóstico de glomerulonefritis fundamentalmente en la presencia de un cociente elevado de proteínas/creatinina en orina.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA)

INTRODUCCIÓN

La identificación de los ANA es una parte importante de la medicina e inmunología clínicas. De hecho, los tests de determinación de ANA están entre los tests serológicos más realizados a nivel mundial en todos los laboratorios de inmunología clínica (Bradwell et al., 1995).

Los ANA son un fenómeno inmunopatológico inespecífico. Aparte de su presencia en bajas concentraciones en individuos sanos, se sabe que muchas enfermedades inflamatorias pueden cursar con títulos elevados de ANA y en algunas de ellas se consideran importantes en su patogenia. Así, se han encontrado títulos positivos de ANA en pacientes con hepatitis crónica (Taniguchi et al., 1992). También enfermedades como la poliartritis, anemia y trombocitopenia parecen estar asociadas con frecuencias significativas de títulos positivos de ANA, a los que se considera como característicos o indicadores de un origen autoinmune (Kass et al., 1985).

En el contexto clínico es importante considerar que las enfermedades inmunomediadas pueden ser primarias o secundarias. En las primarias, existe una respuesta autoinmune dirigida contra las células del animal y sus proteínas antigénicas. En las respuestas

inmunes secundarias esta respuesta se produce como consecuencia de una enfermedad concurrente o por la administración de un fármaco (Gorman y Werner, 1986).

Las enfermedades caracterizadas por la presencia de auto-anticuerpos, tanto primarios como secundarios, pueden ser divididas en dos grupos. Uno de ellos se definiría por la existencia de auto-anticuerpos que reaccionan con antígenos nucleares o citoplasmáticos presentes en la mayoría de tejidos y que carecen por tanto de especificidad tisular. En este grupo se pueden incluir enfermedades como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (LES) y enfermedades mixtas del tejido conectivo como la escleroderma, el síndrome de Sjogren, dermatomiositis y polimiositis (Holian et al., 1975; Day, 1998). Dentro de este grupo se encuadraría la leishmaniosis canina y otras enfermedades inflamatorias crónicas del perro.

El segundo grupo de enfermedades autoinmunes se caracterizaría por auto-anticuerpos que verdaderamente son tejido-específicos. Tal es el caso de la tiroiditis, enfermedad hepática crónica (cirrosis biliar primaria y hepatitis crónica activa), anemia perniciosa, miastenia *gravis* y algunas formas de vasculitis (Day, 1998).

ORIGEN Y PRODUCCIÓN DE LOS ANA

La capacidad del sistema inmune para responder a los antígenos celulares y provocar lesiones es difícil de reconciliar con su naturaleza protectora habitual. Tanto los linfocitos T como los B expresan receptores celulares en su superficie que reconocen los antígenos (Gorman y Werner, 1986). En las células B, los receptores antigénicos son inmunoglobulinas de membrana con la misma especificidad de la inmunoglobulina producida por la célula. Cada clon de células B expresa una especificidad diferente y por tanto responderá únicamente a un antígeno concreto. El receptor de las células T no es una inmunoglobulina pero contiene dos cadenas con un dominio estructural similar a una inmunoglobulina (Gorman y Werner, 1986). La generación de los receptores antigénicos en las células B y T es independiente del Ag y es el resultado final de la recombinación de ADN que se produce durante el desarrollo de los clones celulares en ausencia de antígenos exógenos. Es por tanto un suceso al azar. La consecuencia inevitable de la generación al azar de un repertorio de especificidades es que pueden generarse clones de células T y B que reconocen antígenos propios del animal o auto-antígenos. Estos clones se denominan auto-reactivos. Como existe un recambio constante de células B y T a lo largo de toda la vida del animal, debe haber un mecanismo de control que prevenga la expansión de los clones auto-reactivos, en otro caso la incidencia de enfermedades autoinmunes sería muy grande (Day, 1998).

Inicialmente, y como consecuencia de la aceptación de la teoría de selección clonal de Burnet, los clones de células auto-reactivas no existirían porque serían eliminados durante la ontogenia del animal (Rose, 1981; Avrameas y Ternynck, 1995). Sin embargo, estudios realizados hace algunos años apuntan a que los auto-anticuerpos forman parte del repertorio normal de las células B. Se ha demostrado que para mantener la tolerancia no hay porqué eliminar totalmente los linfocitos que reaccionan con auto-antígenos pero sí debe predominar la supresión (Rose, 1981). El principal mecanismo de control es la supresión, a través de linfocitos T supresores, de los clones auto-reactivos. Existen, no obstante, una serie de factores que pueden comprometer la eficacia de esta auto-supresión (Tabla 1) y que conducen a la formación de auto-anticuerpos o de células T auto-reactivas (Gorman y Werner, 1986). Se ha demostrado que en general es más fácil inducir tolerancia en las células T que en las células B (Rose, 1981).

No obstante, la gravedad de las lesiones tisulares parece estar determinada genéticamente (Prud'homme y Parfrey, 1988). Por tanto, aunque cualquier proceso que active policlionalmente las células B puede estar asociado potencialmente a la presencia de auto-anticuerpos, esto no implica que necesariamente causen lesiones tisulares, esto dependería de los genes que determinan la susceptibilidad del individuo a padecer enfermedades autoinmunes (Prud'homme y Parfrey, 1988).

Etiología	Mecanismo
Activación policlonal de linfocitos B	Los clones de células B son estimulados de forma inespecífica por un patógeno. En este proceso, también se ven estimulados los clones auto-reactivos que producen auto-anticuerpos
<i>Bypass</i> de linfocitos T supresores	La supresión eficaz sufre un <i>bypass</i> cuando un Ag exógeno situado sobre la superficie de una célula induce una respuesta no sólo contra él mismo sino también contra el receptor al que está unido. El ejemplo típico son las enfermedades inmunomediadas inducidas por fármacos
Disfunción de linfocitos T supresores	Una supresión deficiente permite la expansión de clones auto-reactivos T y B. Esta insuficiencia puede estar provocada por hormonas, virus y en algunos casos tener un fondo genético
Actividad exacerbada de linfocitos T helper	La mayor capacidad de los linfocitos T para reconocer e inducir una respuesta inmune puede activar clones auto-reactivos
Modificación de auto-antígenos	La modificación de un auto-antígeno lo transforma en inmunogénico
Reacciones cruzadas	Antígenos expresados sobre Antígenos exógenos (bacterias, virus, proteínas) que comparten determinantes con células del animal
Auto-Ac naturales	Repertorio amplio de anticuerpos auto-reactivos de baja afinidad

Tabla 1.- Etiopatogenia de los fenómenos autoinmunes (Gorman y Werner, 1986; Hahn, 1998).

La hiperactividad de las células B puede ser secundaria a defectos hereditarios en su regulación o puede ser la consecuencia de una hiperactividad de las células T *helper* (Prud'homme y Parfrey, 1988). También, en estados patológicos que impliquen una mayor lisis

de células o tejidos, la mayor cantidad de auto-antígenos presentados al sistema inmune podría superar los mecanismos fisiológicos de regulación, de la misma forma que si los auto-antígenos se asociaran o fueran similares a antígenos externos. La consecuencia es que ciertas proteínas normalmente ausentes o presentes en poca cantidad serían presentadas a las células T provocando su activación. Las células T a su vez, iniciarían una activación policlonal de células B responsable de la síntesis de auto-anticuerpos (Avrameas y Ternynck, 1995). De hecho, se ha demostrado la aparición de auto-anticuerpos tras infecciones tanto en personas como en animales de experimentación. Parte de esta activación policlonal se debería a la existencia de identidad molecular entre el organismo patógeno y los auto-antígenos del animal (Avrameas y Ternynck, 1995). Esta respuesta autoinmune puede desencadenarse aunque el mimetismo entre antígenos no sea muy fiel. Por ejemplo, el adenovirus tipo 2 tiene secuencias de aminoácidos similares a los de la mielina y se ha visto que fragmentos cortos de 10 aminoácidos, de los cuales sólo 5 son idénticos a la proteína básica de la mielina, son los responsables de la formación de auto-anticuerpos (Steinman, 1993). No todas las personas infectadas por el adenovirus tipo 2 desarrollan esta respuesta inmunitaria. La causa parece residir en el tipo de HLA (human leucocyte antigen) que tenga cada persona. Las moléculas del HLA determinan exactamente qué fragmentos del organismo patógeno se exponen en la superficie de las células T. Un determinado HLA puede unirse con un fragmento mimético y presentarlo al sistema inmunitario, mientras que otro puede

unirse a un fragmento del patógeno sin mimesis alguna con elementos del organismo. Otro ejemplo de la predisposición individual es el hecho de que las personas con el tipo HLA-DR4 tienen una probabilidad seis veces mayor de contraer artritis reumatoide. El LES también se ha asociado con ciertos tipos de HLA (Steinman, 1993).

Frente a la teoría de la activación policlonal como fuente de los ANA, Radic y Weigert (1995) afirman que su origen cierto es la inmunización frente al ADN, histonas y otras nucleoproteínas. Esta afirmación se basa en el carácter único del espectro de auto-anticuerpos que muestran la mayoría de personas con ANA. Este espectro particular de cada reacción frente a un Ag complejo como las nucleoproteínas es una característica exclusiva de los procesos de inmunización activa. La razón para la gran frecuencia de ANA es que estos antígenos son abundantes y también muy inmunogénicos comparados con otros auto-antígenos (Radic y Weigert, 1995).

La capacidad de formar anticuerpos contra la cromatina, nucleosomas o ADN depende en parte de cierta susceptibilidad antigénica (Hahn, 1998). Los antígenos que inician la formación de anticuerpos anti-ADN potencialmente patogénicos pueden ser la cromatina (paquetes de nucleosomas conectados por proteínas conectoras del ADN) o los nucleosomas (166 a 240 pares de bases de ADN enrollados alrededor de un complejo octamérico de varios tipos diferentes de histonas (Hahn, 1998).

Otra hipótesis es la de expansión de la reactividad. Se denomina así al proceso mediante el cual la respuesta de los linfocitos T y B frente a un antígeno, se expande para incluir la reactividad frente a otros antígenos adicionales. Este mecanismo depende de la generación de receptores antigénicos sobre las células T que sean capaces de unirse a más de un complejo péptido-HLA. Por tanto, células B y T inicialmente activadas por un único Ag, eventualmente reaccionan con múltiples antígenos exógenos o endógenos. A través de este mecanismo, exposiciones múltiples a antígenos bacterianos, víricos o químicos al igual que auto-antígenos (especialmente complejos de ácidos nucleicos y proteínas) conducen a la formación de anticuerpos frente a ADN (Hahn, 1998).

MECANISMOS DE ACCIÓN PATOGENICA

En el perro, se ha descrito la presencia de ANA en LES, pénfigo eritematoso, pénfigo vulgaris, tiroiditis linfocítica, artritis reumatoide, polimiositis idiopática, anemia autoinmune hemolítica, endocarditis, dirofilariosis, demodicosis generalizada, hepatopatías crónicas y varios tipos de cáncer (Andersson y Sevelius, 1992; Kelly et al., 1994).

Los ANA pueden contribuir patogénicamente mediante la formación de complejos inmunes circulantes con los antígenos nucleares o mediante la unión directa con la membrana basal de los glomérulos, similar a la observada en la leishmaniosis canina. No

obstante, la glomerulonefritis asociada al LES puede desarrollarse en ausencia de concentraciones detectables de ANA, algo que también ocurre en el perro (Monestier et al., 1995).

En general, los CIC actúan depositándose en ciertos puntos, especialmente la membrana basal del riñón, sinovia, piel y plexo coroideo. Esta es la clásica reacción de hipersensibilidad de tipo III y está asociada al consumo del Complemento por los CIC y su activación en el punto de precipitación (Schur y Sandson, 1968; Gorman y Werner, 1986). En el LES los ANA forman parte de la mayor fracción de CIC, hasta el punto que existe una relación inversa entre los niveles de Complemento y ANA (Morse et al., 1962). Esta típica reacción de tipo III producida por el depósito de CIC se asocia casi siempre con la afectación de múltiples órganos (Schur y Sandson, 1968; Gorman y Werner, 1986). Algo que es característico de la leishmaniosis canina.

En la patogenia de la glomerulonefritis, las histonas parecen tener una importancia especial. Las histonas catiónicas pueden unirse directamente a la membrana glomerular basal, cargada negativamente y actuar como antígenos fijos para los ANA. Las histonas y los anticuerpos anti-histonas se han eluído de los depósitos glomerulares de proteínas en ratones con LES. La alta incidencia de lesiones renales en el LES canino puede por tanto estar relacionada con la presencia de IgG anti-histonas. Esto parece sugerir el hecho de que en

perros con LES sólo los anticuerpos IgG para las histonas H1, H2A, H3 y H4 estaban significativamente elevados comparado con perros normales (Monestier et al., 1995).

Históricamente, de todos los ANA, los anticuerpos anti-ADN parecen reunir el mayor potencial patogénico. Algunos anticuerpos para ADN de doble cadena (ds-DNA), producen glomerulonefritis mediante la formación de complejos que pasivamente quedan atrapados en los glomérulos. Otros causan glomerulonefritis uniéndose directamente a las estructuras glomerulares. El daño celular se produce por la unión directa de los anticuerpos a la superficie de la membrana celular o bien por su entrada al interior de la célula y su unión al núcleo. Si se forman CIC de ADN y ANA son atrapados en la membrana basal de los capilares glomerulares, fijan el Complemento y dañan los tejidos próximos. Algunos subgrupos patogénicos de anticuerpos para el ADN son capaces de unirse a las células epiteliales tubulares. Si permanecen unidos a las membranas, inducen la muerte celular mediada por el Complemento. Si pasan al interior de la célula y se unen al núcleo, probablemente alteran todas sus funciones celulares pero el mecanismo exacto todavía no se conoce (Schur y Sandson, 1968; Hahn, 1998).

Los títulos elevados de anticuerpos séricos para ADN de doble cadena (ADN-dc) se han correlacionado con la presencia de LES activo y especialmente con glomerulonefritis en muchos estudios. El

suero de algunos pacientes con LES y glomerulonefritis, aunque no siempre, contiene inmunoglobulinas que se unen a los extractos de la membrana basal glomerular. El pre-tratamiento de los extractos con enzimas para el ADN elimina la mayoría de la reactividad. Esto sugiere que los anticuerpos para ADN producen nefritis mediante su unión a ADN fijado sobre la membrana basal del glomérulo (Schur y Sandson, 1968; Tan, 1982; Hahn, 1998). Estas lesiones no sólo se producen por los ANA propios del animal, sino que experimentalmente se ha visto que la inyección de CIC de otro animal producía las mismas lesiones en el animal sano (Tan, 1982).

Se desconoce qué características marcan la diferencia entre anticuerpos anti-ADN patogénicos y no patogénicos. La fijación del Complemento debe ser esencial para que se produzca daño tisular. Así, las IgG1 e IgG3, capaces de fijar el Complemento, son más abundantes en los anticuerpos patogénicos (Hahn, 1998).

La prueba definitiva del papel patógeno de los ANA en el LES se hizo mediante técnicas de inmunofluorescencia, demostrando *in situ* sobre la membrana basal del glomérulo, el depósito de ADN antigénico. También se demostró que, en los eluidos de inmunoglobulinas a partir de homogeneizados del riñón, la concentración de ANA era varias veces superior a la del suero, indicando que el riñón actúa como una trampa o depósito para estos anticuerpos (Tan, 1982).

Los ANA circulantes que no están unidos al Complemento, probablemente no son patogénicos y para algunos autores no producen lesiones tisulares cuando se introducen en células intactas. La presencia de poliartritis (con o sin linfadenopatía), anemia y trombocitopenia parecen representar factores de riesgo para tener títulos ANA positivos y son además síntomas de enfermedad autoinmune (Kass et al., 1985).

La presencia de títulos altos persistentes de ANA no ha de estar siempre correlacionada con el depósito de CIC especialmente si el Ac circula en ausencia de Ag. Por el contrario, títulos bajos de ANA anti-ADN puede ser significativos si su baja concentración se asocia con la formación de complejos Ag-Ac y no con una menor producción. De forma opuesta, la presencia de ADN libre circulante no connota una situación de exceso de Ag si no hay anticuerpos presentes al mismo tiempo. Niveles elevados de ADN circulante se han detectado en pacientes con enfermedades hepáticas sin que haya vasculitis por CIC secundaria (Tan, 1982).

TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN

La detección de anticuerpos circulantes frente a antígenos nucleares ha sido una herramienta importante en la investigación de las enfermedades reumáticas sistémicas (Fritzler, 1992). Los primeros trabajos emplearon diversos substratos como por ejemplo piel

humana, leucocitos humanos, hígado de ratón, esófago de mono, etc (Goodman et al., 1960; Hall et al., 1960; Beaucher et al., 1977).

La prueba de la célula del LE está diseñada para detectar polimorfonucleares fagocitando restos nucleares marcados con anticuerpos. Este test detecta anticuerpos circulantes frente a un Ag nuclear específico, la deoxyribonucleoproteína (DNP) (Kass et al., 1985). Este método produce falsos positivos en muestras de perro (Jones, 1993).

En el caso concreto del perro, la determinación precisa de los ANA caninos se ve dificultada por la capacidad del suero canino para unirse al ADN de forma inespecífica bajo ciertas condiciones. Esto se debe a una beta-globulina ácida que se une al ADN heterólogo en el rango fisiológico del pH (Shull et al., 1983).

Inmunofluorescencia indirecta

El principio de esta técnica consiste en la puesta en evidencia de un complejo inmunológico en el que el anticuerpo está marcado con un fluorocromo que da fluorescencia al iluminarlo con luz ultravioleta (González y Rothfield, 1966; Lapras y Monier, 1971; Quimby et al., 1980; Tizard, 1992).

Los inicios de la inmunofluorescencia indirecta datan de 1942, cuando se publicó un método para la detección de material antigénico

en células de tejidos en los cuales un Ac marcado con fluoresceína se empleaba como una tinción histoquímica específica (Coons y Kaplan, 1950). Tras varias observaciones, se comprobó que la molécula de Ac podía marcarse con distintos componentes, sin que se modificara su capacidad de reaccionar frente a un Ag específico (Coons y Kaplan, 1950). Este método se empleó, al principio, para la demostración de las rickettsias y de ciertos antígenos de virus. El Ac marcado, al reaccionar frente a los antígenos específicos, queda fijo en la preparación, mientras que el que no se ha fijado es arrastrado con el lavado. Se examina entonces con un microscopio de fluorescencia, considerándose como positivo la evidencia de una luminosidad amarillo-verdoso brillante en el sitio donde se localiza el Ag específico de ese Ac marcado. Los requerimientos principales de esta técnica son que los antígenos de los cortes de tejidos conserven su actividad inmunológica y que la arquitectura y la citología del tejido se mantengan. Para ello, se prefiere usar secciones de tejido sin fijar rápidamente congelado ya que presentan una adecuada citología y prácticamente no se inactivan los antígenos. Existe una variante de este método que usa parafina para incluir los cortes de tejidos (Coons y Kaplan, 1950).

En comparación con otras técnicas, los métodos de fluorescencia para la determinación de ANA (FANA), tienen la ventaja de su sensibilidad, reproducibilidad y facilidad técnica (Fritzler, 1992). La técnica permite detectar un rango muy amplio de ANA porque la

mayoría de antígenos nucleares están presentes en los tejidos usados como substrato (Fritzler, 1992).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es un método ampliamente usado fundamentalmente en el diagnóstico del LES humano, que además permite estudiar los distintos patrones de fluorescencia obtenidos (Morse et al., 1962; Tan, 1982)). No requiere material radioactivo y es más sensible que la prueba de células LE. Las técnicas de inmunofluorescencia desde hace tiempo se mostraron útiles también para el diagnóstico de LES en el perro (Lapras y Monier, 1971) y es el método que se ha venido utilizando hasta ahora (Halliwell, 1982). De ahí que la inmunofluorescencia sea el método más aceptado como técnica de diagnóstico (Lapras y Monier, 1971; Tan, 1982; Gelberg et al., 1985; Kass et al., 1985; Brandonisio et al., 1990; Nakamura y Robbins, 1992).

En todos los métodos IFI, se emplea un substrato para fijar los auto-anticuerpos buscados (Astion et al., 2000). Usando un microscopio con epifluorescencia y analizando la intensidad y el patrón de inmunofluorescencia, se clasifican los sueros como positivos o negativos. Los positivos deben tener tanto un patrón identificable como una intensidad de fluorescencia mayor que el valor umbral establecido como negativo. Cuanto mayor es la fluorescencia, mayor es la probabilidad de que el resultado sea clínicamente relevante. La intensidad de la fluorescencia acostumbra a expresarse mediante el

título, que es la dilución más alta a la cual la intensidad de fluorescencia es igual al control negativo (Astion et al., 2000). Una de las mayores dificultades en la interpretación de los resultados de IFI es la reacción de fondo debida a la unión inespecífica de auto-anticuerpos circulantes clínicamente no relevantes (Astion et al., 2000).

La elección del substrato es uno de los factores técnicos más importantes en las pruebas de FANA (Fritzler, 1992). Los estudios comparando varios substratos han demostrado que son comparables en su capacidad para cuantificar los títulos de anticuerpos (Fritzler, 1992). Algunas encuestas de calidad hechas para varios métodos IFI en muchos laboratorios americanos, detectaron diferencias del orden de 64x en los títulos de ANA en el mismo suero. Esto se atribuye a los numerosos tipos de substratos que se han empleado. Cada uno de estos substratos contiene diferentes antígenos y esto provoca problemas de especificidad y sensibilidad (McVey y Shuman, 1991).

Tipos de substratos

Hígado de rata

De entre todas las técnicas empleadas, la inmunofluorescencia indirecta usando el hígado de rata como substrato ha sido el método más empleado y aceptado y se considera un método útil para la determinación de ANA en el perro (Bell et al., 1997). Por su sencillez,

muchos laboratorios usan este método para el estudio inicial de las muestras antes de emplear otras técnicas más elaboradas y que permiten detectar la especificidad de los anticuerpos (Fritzler, 1992).

La técnica, descrita por diferentes autores, consiste en usar como substrato criocortes de hígado congelado, incubarlos con el suero problema, añadirles el Ac específico marcado con isotiocianato de fluoresceína unido a la fracción Fc de la inmunoglobulina, y observarlo al microscopio de fluorescencia en fondo oscuro excitado por luz ultravioleta producida por una lámpara de vapor de mercurio (Coons y Kaplan, 1950; Goodman et al., 1960; Barnett y Vaughan, 1966; González y Rothfield, 1966; Lapras y Monier, 1971; Schur et al., 1972; Monier et al., 1980; Shull et al., 1983; Gelberg et al., 1985; Nakamura y Robbins, 1992).

Los cortes de tejidos congelados han sido casi totalmente reemplazados por los cultivos celulares. En general, los cultivos celulares son más sensibles y fiables que los criocortes de tejidos pero las variaciones intra-ensayo son altas, pues la mayoría de laboratorios no obtienen títulos finales a intervalos menores de diluciones cuádruples (Tan, 1982; Fritzler, 1992).

Células Hep-2

Las células Hep-2 son un línea inmortal de células obtenidas a partir de un carcinoma laríngeo humano (human epithelioma type 2).

Cada vez más están reemplazando a los tejidos de roedores debido a las numerosas ventajas que ofrecen (Bradwell et al., 1995):

- . Los núcleos son más grandes y permiten apreciar detalles nucleares complejos.
- . Su disposición en capas monocelulares asegura que los núcleos son visibles.
- . La tasa de división celular es mayor y permite la expresión de antígenos que se producen sólo durante la fase de división celular como los centrómeros y el huso mitótico.
- . No existe matriz de tejido conectivo que dificulte la observación de las células.
- . La distribución de antígenos es uniforme.

Constituyen el substrato empleado por el 90% de laboratorios humanos para las pruebas de ANA por IFI (Astion et al., 2000). La mayor sensibilidad de los cultivos celulares se debe a que sus núcleos son mayores y algunos antígenos están presentes en mayor concentración en estas células tumorales poco diferenciadas que en tejidos muy diferenciados como son el hígado o el riñón (Tan, 1982; Fritzler, 1992). Puesto que la expresión de ciertos antígenos nucleares manifiesta diferencias cualitativas y cuantitativas en los diferentes substratos, las pruebas IFI pueden ser negativas en cortes de órganos y positivas en cultivos celulares o al contrario (Fritzler, 1992). En cualquier caso, los cultivos celulares proporcionan un substrato que contiene una mayor variedad de antígenos nucleares y es más

aconsejable para reducir la proporción de falsos negativos (Fritzler, 1992).

Crithidia sp.

El protozoo flagelado *Crithidia luciliae* se ha demostrado como un substrato útil para detectar anticuerpos específicos para ADN nativo. Posee una gran mitocondria que contiene ADN relativamente libre de otros antígenos nucleares como las histonas (Halliwell, 1982; Fritzler, 1992).

A diferencia de otros ensayos IFI que detectan sólo anticuerpos de alta afinidad, este método detectan tanto anticuerpos de alta como de baja afinidad (Bentwich et al., 1988).

En el perro, algunos autores consideran que la técnica de *Crithidia* carece de sensibilidad suficiente para ser empleada como técnica de rutina, además parece detectar preferentemente anticuerpos para ADN de doble cadena (ADN-dc) de baja afinidad y recomiendan el empleo de métodos ELISA que son positivos en el 90% de perros con LES (Halliwell, 1982; Jones, 1993).

En el suero canino parece haber ciertos componentes no específicos que se unen al ADN e interfieren con la unión de los anticuerpos anti-ADN (Andersson y Sevelius, 1992). Monier et al.

(1988) emplearon este ensayo para detección de ADN-dc en perros con LES partiendo de una dilución inicial de 1:2.

En diferentes enfermedades reumáticas humanas se ha demostrado una relación entre la especificidad de diferentes auto-anticuerpos, el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad. Los métodos habitualmente más usados para identificar la especificidad de los ANA son la inmunodifusión de Ouchterlony, la contraimmunoelectroforesis y el ELISA (Henriksson et al., 1998).

Inmunodifusión y contraimmunoelectroforesis

La técnica de doble difusión es el método más sencillo de diferenciar la especificidad de los ANA. El test se basa en el método descrito por Ouchterlony. Los antígenos nucleares solubles denominados ENA (extractable nuclear antigens), se colocan en el pocillo central cortado en una placa de agarosa y se dejan difundir. El suero del paciente se coloca en pocillos individuales periféricos que rodean al extracto de ENA. Entre el pocillo central y los periféricos se establece un gradiente de concentraciones de cada uno de los componentes de la reacción: antígenos y anticuerpos. Si el suero del animal contiene los anticuerpos específicos, se forma una línea visible de precipitación en el punto de equivalencia. La especificidad de los anticuerpos del suero problema se conoce colocando a su lado un suero control de especificidad conocida y buscando la aparición de líneas de identidad, no identidad o identidad parcial. La línea de

identidad se produce por la fusión de las líneas de precipitación de una muestra con la del control positivo de especificidad conocida situado en el pocillo periférico adyacente. Se forma una línea continua, que indica que la muestra contiene el mismo Ag que el control positivo (Wilson y Sanders, 1992).

La línea de identidad parcial se caracteriza por la fusión de líneas pero con la formación de un “espolón” en el extremo. Este tipo de reacción ocurre si los anticuerpos presentes en la muestra y el control desarrollan una reacción idéntica con ciertos componentes del antígeno y una reacción no idéntica con otros componentes. Por ejemplo, las muestra con anticuerpos frente a Sm y nRNP pueden producir líneas de identidad parcial (Wilson y Sanders, 1992).

La línea de no-identidad se produce cuando los anticuerpos en la muestra del paciente y suero control reaccionan frente a diferentes antígenos apareciendo líneas de precipitación cruzadas o en forma de “X” (Wilson y Sanders, 1992).

Aunque este método no tiene la sensibilidad de otros ensayos, es por el contrario muy específico. Al ser un método que depende de la inmunoprecipitación, debe haber grandes cantidades de anticuerpos precipitantes de los isotipos IgG e IgM para que las líneas de precipitación sean visibles. Algunos auto-anticuerpos pueden estar en suficiente concentración como para formar líneas de

inmunoprecipitación en técnicas de doble difusión sobre agar o agarosa. En personas con LES los niveles de ANA precipitantes son por lo general suficientes para demostrar su presencia mediante doble inmunodifusión. En trabajos clínicos comparando los métodos ELISA comercialmente disponibles frente a la clásica doble inmunodifusión, el ELISA no demostró representar una mejoría significativa (Tan, 1982; Wilson y Sanders, 1992).

La principal ventaja de la doble difusión es permitir la identificación de ANA frente a antígenos concretos y conocer por tanto su especificidad (Tan, 1982). Los patrones de fluorescencia de los ANA son simplemente indicativos y es necesario recurrir a esta y otras técnicas como la contra-inmunolectroforesis (CIE), ELISA o *immunoblotting*, para confirmar su especificidad antigénica con precisión (Bradwell et al., 1995).

El mayor interés de estas técnicas se basa en la detección de ciertas especificidades de ANA que tienen implicaciones clínicas concretas. Por ejemplo, la demostración de la presencia de ANA para el antígeno Sm en una persona con artralgia y erupción cutánea es muy indicativa de LES (Wilson y Sanders, 1992). El significado clínico de muchas especificidades de los ANA está por determinar en el perro.

ELISA

Las pruebas de enzimo-inmunoensayo usando diferentes tipos de conjugados se empezaron a desarrollar en 1973 (Tan y Epstein, 1973; Pesce et al., 1974), aplicadas fundamentalmente a la detección de ANA anti ADN-dc y ADN de cadena simple (ADN-cs). Los métodos iniciales presentaban una variabilidad inter-ensayo considerable pero permitían ya la cuantificación de los niveles de ANA (Pesce et al., 1974).

Aplicando un método ELISA para la detección de anticuerpos anti-ADN-dc, se obtuvieron resultados positivos en el 2,5% de perros sanos, pero en otro estudio similar donde se realizó un seguimiento clínico de los perros positivos sin síntomas, el 85% desarrolló LES en los años sucesivos (Jones, 1993). Esto contradice estudios recientes donde aparentemente los anticuerpos anti-ADN-dc no aparecen en el LES canino (Monestier et al., 1995).

Actualmente, la tendencia en medicina humana es la sustitución de las técnicas de IFI por técnicas de EIA como el ELISA (Astion et al., 2000). Estos métodos ELISA pueden ser automatizados y permiten el empleo de antígenos naturales purificados o de antígenos recombinantes con el fin de detectar los tipos específicos de ANA que tienen valor diagnóstico y pronóstico para cada enfermedad (Olaussen y Rekvig, 1999). La correlación entre los resultados usando células

Hep-2 como sustrato y algunos sistemas ELISA se ha estimado en un 89% (Olaussen y Rekvig, 1999).

ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA

Los ANA constituyen una población muy heterogénea de anticuerpos dirigidos contra varios antígenos nucleares y por este motivo, para su detección inicial, se emplea todo el núcleo de la célula como sustrato. Posteriormente se emplean técnicas que permiten establecer la especificidad de los ANA, es decir, contra qué antígenos nucleares concretos están dirigidos. Conocer la especificidad antigénica de los ANA es fundamental para establecer su asociación con enfermedades concretas e investigar su actividad patogénica (White et al., 1992).

Los métodos analíticos para la determinación de la especificidad de los ANA están indicados en la evaluación de cualquier paciente con sospechas de tener una enfermedad reumática sistémica. En el pasado, se ha sugerido que la especificidad de los ANA estaba clínicamente indicada cuando las pruebas de inmunofluorescencia (FANA) eran positivas. Sin embargo, cuando los así llamados pacientes ANA-negativos se incluían en los análisis de inmunodifusión, los sueros FANA negativos de varios de ellos eran positivos para antígenos como el SS-A/Ro (Wilson y Sanders, 1992).

Algunos auto-anticuerpos parecen ser marcadores de enfermedad, es decir, que parecen estar restringidos a ciertas enfermedades mientras que otros no son específicos (Tabla 2). Otros ANA tienen tanto valor diagnóstico como pronóstico. El mejor ejemplo son los ANA para ds-DNA que tienen una sensibilidad del 30-70% y una especificidad >95% para el diagnóstico y pronóstico del LES. Los pacientes con ANA ds-DNA tienden a sufrir lesiones renales y la actividad de la enfermedad está correlacionada con los niveles cuantitativos de ANA anti ds-DNA. Su pronóstico es peor comparado con pacientes con LES que no desarrollan este tipo de ANA (Astion et al., 2000).

Existen básicamente tres grupos principales de auto anticuerpos: los anticuerpos antinucleares (ADN-dc, histonas); anticuerpos para ENA (Sm, RNP, etc) y los anticuerpos anti-fosfolípidos (Gorman y Werner, 1986).

Los anticuerpos anti ADN-dc se consideran como los más específicos del LES humano. En el perro, los ANA se detectan en el 75-90% de animales con LES, pero el rango de auto-anticuerpos es más limitado y no se han podido establecer asociaciones clínicas entre la especificidad de los ANA y los síntomas de la enfermedad (Jones, 1993). Sin embargo, sí se ha establecido una correlación entre la especificidad y el título de ANA respecto a la gravedad de los síntomas (Jones, 1993).

Especificidad del Anticuerpo	Enfermedad asociada
ADN nativo	LES (50-60%)
Antígenos Sm	LES (30%)
Histonas	LES (<60%); LES inducido por fármacos (95%); artritis reumatoide (20%)
SS-A	Síndrome de Sjögren (70%); LES (30-40%); Escleroderma: raro, títulos bajos
SS-B	Síndrome de Sjögren (60%); LES (15%)
RNP	Enfermedad conectiva mixta (95-100%); LES (30%, títulos bajos); Escleroderma: raro, títulos bajos
PCNA	LES (<5%)
Scl-70	Escleroderma (10-20%)
Antígenos nucleolares	Escleroderma (40-50%)
Antígenos centrómero	CREST (80-90%)
RANA	Artritis reumatoide (85-95%)
PM-1	Polimiositis (50%); Dermatomiositis (10%)

Tabla 2.- Enfermedades asociadas a los principales tipos de ANA. CREST: Calcinosis - Raynaud's - disfunción esofágica - esclerodactilia - telangiectasia. (Sharp et al., 1972; Tan, 1982; Tan, 1983).

Los ensayos para la detección de anticuerpos anti-histonas han sido especialmente recomendados en el LES canino. Sin embargo, estos ANA también se detectan en otras enfermedades diferentes al LES (Jones, 1993).

Anticuerpos antinucleares frente a ADN

Estos anticuerpos se denominan ANA para ADN nativo (Tan, 1982). El ADN también puede unirse a anticuerpos que son específicos para otros antígenos; esta reactividad cruzada puede ser importante en la patogenia de muchas enfermedades (Tan, 1982; Hahn, 1998). Entre los antígenos que pueden dar reacción cruzada con los ANA para ADN-dc se han citado la cromatina, nucleosomas, componentes de la membrana basal del glomérulo, laminina, heparán sulfato, colágeno tipo IV, ADN-cs y nucleosomas (Hahn, 1998).

En pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas la detección de ciertas especificidades de ANA tiene implicaciones clínicas significativas. Así, se considera que los métodos para detectar anticuerpos frente a ADN, especialmente ADN-dc, poseen el mayor valor diagnóstico en pacientes donde se sospecha de LES, y en este tipo de pacientes a menudo los resultados correlacionan con la actividad clínica de la enfermedad y con el riesgo de glomerulonefritis (Hahn, 1998). Sin embargo, estos no son los únicos ANA capaces de producir nefritis: algunos subgrupos de anticuerpos IgM para ADN y algunos anticuerpos para ADN de una cadena (ADN-cs) son también capaces de producir lesiones renales. No obstante, su utilidad diagnóstica es menor, pues también se detectan en pacientes con otras enfermedades inflamatorias diferentes al LES y en personas sanas (Hahn, 1998).

En el LES canino, la presencia de ANA anti ADN parece ser excepcional según diversos trabajos empleando técnicas diferentes. En esto parece radicar la mayor diferencia biológica entre la enfermedad humana y canina (Chabanne et al., 1995).

El método de *Crithidia* permite la detección específica de ANA para ds-DNA gracias a su unión con el quinetoplasto de *Crithidia luciliae*, un protozoo con una estructura circular de ADN-dc en uno de sus polos. Este método detecta casi exclusivamente anticuerpos para ds-DNA (Hahn, 1998).

Anticuerpos antinucleares frente a ENA

Los anticuerpos frente a los antígenos nucleares Sm y nRNP se han denominado anticuerpos frente a antígenos nucleares solubles o extraíbles (ENA) (Tan, 1982). Más tarde, se vio que muchos antígenos nucleares no histónicos son fácilmente extraíbles en solución salina o cualquier otro buffer fisiológico y la lista de ENA se ha visto ampliada (Tan, 1982).

Los anticuerpos frente al Ag Sm se consideran un marcador serológico de LES. Muchos estudios han demostrado que se trata de un Ag nuclear no asociado a las histonas (Tan, 1982). Al contrario que el Ag Sm, el Ag nRNP no es característico de ninguna enfermedad concreta (Tan, 1982).

En un estudio previo, el suero de 132 perros con problemas autoinmunes, inflamatorios y neoplásicos se analizó mediante contraelectroforesis (CIE) frente a extractos de timo y bazo bovino para investigar la existencia y especificidad de ANA frente a antígenos nucleares extraíbles (ENA). Las muestras positivas se ensayaron frente a sueros patrón humanos específicos para los siguientes antígenos: ss-DNA, Sm, Ro, La (estos 3 últimos reciben su denominación de las dos primeras letras del nombre del primer paciente donde se encontraron), RNP, Scl y PCNA (antígeno de proliferación nuclear). De los 132 perros investigados, 15 sueros fueron positivos y contenían anticuerpos frente a ENA. En 4 perros con LES y positivos a ENA en el método de CIE, dos habían sido negativos en pruebas de FANA. Otros perros positivos padecían pioderma facial, lupus eritematoso discoide y otro perro pénfigo eritematoso. En 3 perros, los anticuerpos ENA eran los únicos ANA presentes (White et al., 1992).

Muchas enfermedades del perro parecen estar asociadas con títulos positivos de ANA, pero en todos los casos, las enfermedades donde se encontraron fueron enfermedades autoinmunes o con un componente de autoinmunidad, tales como LES, LED, vitiligo, dermatomiositis y queratitis superficial crónica (White et al., 1992).

En el perro con LES se han identificado los anticuerpos para ENA T1 (20% de casos) y T2 (9% de casos) que no tienen ningún equivalente en el hombre (Chabanne et al., 1995). Del resto de ENAs, el anticuerpo anti-Sm es el único que se encuentra con más frecuencia (16% de casos) mientras que el resto se detectan de forma excepcional (anti-RNP y anti-SSA) o nunca (Chabanne et al., 1995).

Se han encontrado anticuerpos frente a ENA en el 86% de los pacientes con nefritis y LES que respondieron al tratamiento pero sólo en el 8% de los pacientes que no respondieron (Sharp et al., 1971). Su determinación puede tener por tanto cierto valor pronóstico.

Anticuerpos antinucleares frente a histonas

Las histonas son proteínas nucleares básicas que contienen gran cantidad de aminoácidos cargados positivamente como la lisina y arginina. Estudios recientes han establecido la disposición *in situ* de las histonas en el núcleo y han demostrado que constituyen un componente esencial de los nucleosomas. La estructura monomérica de un nucleosoma es una asociación octamérica de 2 moléculas de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Alrededor de este octámero hay ADN con una longitud de 146 parejas de bases y conectando un nucleosoma con el siguiente, existe una cantidad variable de ADN de unión. La histona H1 no es un componente intrínseco del nucleosoma pero parece jugar cierto papel en la unión entre nucleosomas (Tan, 1982).

El significado clínico de los anticuerpos anti-histonas está bien establecido en reumatología humana. Tres enfermedades se asocian con su presencia: LES, LE inducido por fármacos y artritis reumatoide. La alta prevalencia de anticuerpos anti-histonas en el LE inducido por fármacos es manifiesta en las pruebas de inmunofluorescencia sin recurrir a ensayos específicos. En el LES el complejo bimolecular H2A-H2B es el Ag dominante (Tan, 1982).

La frecuencia de anticuerpos anti-histonas es de un 30-70% en el LES canino. A diferencia del hombre, en el perro los anticuerpos se dirigen contra las histonas H3, H4 y H2A (Chabanne et al., 1995).

ISOTIPOS DE ANA

Goodman et al. (1960) fueron los primeros en demostrar la presencia de ANA tanto IgG como IgM, y trabajos posteriores han identificado también ANA IgA (González y Rothfield, 1966). La mayor parte de ANA son de la clase IgG, un porcentaje menor de la clase IgM y otro porcentaje aún menor de la clase IgA (Tan, 1983).

La expresión específica de clases y subclases de anticuerpos en las diferentes respuestas inmunes está relacionada probablemente con factores tales como la naturaleza del Ag que inicia la respuesta y la presencia local de determinadas citocinas que regulan la expresión de un determinado isotipo de inmunoglobulina (Day, 1996). Parece por

tanto interesante investigar la distribución de clases y subclases de inmunoglobulinas en las respuestas autoinmunes específicas para ADN, histonas, ENA y otros antígenos.

Algunos trabajos han determinado la especificidad de las subclases de IgG en perros con títulos positivos de ANA (Day, 1996). Se encontró que los auto-anticuerpos de las subclases IgG1, IgG3 e IgG4 eran los predominantes y que había niveles relativamente bajos de ANA IgG2. Esta respuesta es claramente policlonal y es un rasgo característico de la autoinmunidad espontánea en pacientes humanos y en modelos experimentales de autoinmunidad en ratones.

En modelos animales como los ratones con LES parece existir una deriva hacia la producción de anticuerpos IgG en vez de IgM a medida que aumenta la edad del animal. Este cambio o deriva se correlaciona clínicamente con la aparición de lesiones tisulares (Prud'homme y Parfrey, 1988).

El primer Ac en ser sintetizado después de una inmunización activa es siempre de la clase IgM. Más tarde sus niveles bajan y se elevan los niveles de IgG. Sin embargo, los datos en personas con LES muestran que la incidencia de ANA de tipo IgM en personas con más de 10 años de evolución clínica es similar a la de pacientes donde la enfermedad se acaba de diagnosticar (González y Rothfield, 1966). Se ha sugerido que la producción continuada de ANA IgM depende de

la persistencia del antígeno. Es posible que como el antígeno está presente durante periodos prolongados en pacientes con LES, la producción de ANA de la clase IgM se mantenga. La presencia de ANA de la clase IgG dentro de la primera semana del diagnóstico sugiere que el proceso básico que da inicio al proceso clínico debe haber evolucionado a lo largo de un periodo mucho más largo (González y Rothfield, 1966). La inmunoglobulina G es la más patogénica de los ANA debido a su capacidad de iniciar la cascada del Complemento, mecanismo inicial de la destrucción tisular (Kass et al., 1985).

Los anticuerpos anti-ADN son especialmente importantes en la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes sistémicas como el LES. Estos anticuerpos forman parte del repertorio normal de auto-anticuerpos de cada individuo. La mayoría de estos ANA son del isotipo IgM y caracterizados por su baja afinidad, de forma que reaccionan débilmente con sus auto-antígenos específicos. Sin embargo, si se produce un cambio isotípico (de IgM a IgG) manteniendo su especificidad, su potencial patógeno aumenta significativamente. Además, las mutaciones somáticas en los genes que codifican las inmunoglobulinas pueden desencadenar la producción de anticuerpos IgG de alta afinidad frente al ADN. Este es el tipo de anticuerpo que con mayor frecuencia se asocia con glomerulonefritis en pacientes con LES (Hahn, 1998).

INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LOS ANA

Título

Existe controversia sobre qué título debemos considerar como positivo. La dilución inicial en las pruebas de FANA empleando células Hep-2 se hace normalmente al 1:40 (Bradwell et al., 1995). Otros autores proponen empezar con diluciones más bajas del 1:4 o 1:16 e investigar títulos más elevados de 1:64 hasta 1:256 sólo en las muestras positivas (Fritzler, 1992). Esto es importante para determinar no sólo la positividad de la muestra sino también porque el patrón de fluorescencia puede cambiar según la dilución del suero (Fritzler, 1992).

La frecuencia de títulos de ANA positivos en individuos sanos menores de 60 años se ha estimado entre el 2% y el 10%. En individuos mayores de 60 años, aproximadamente el 38% de ellos tienen títulos de ANA significativamente elevados (Allen, 1991; Taniguchi et al., 1992). Su presencia en situaciones donde no existan síntomas clínicos compatibles no implica necesariamente la existencia de enfermedad reumática (Allen et al., 1991).

En perros las diluciones iniciales varían entre 1:8 a 1:64 según el laboratorio (Chabanne et al., 1995). Hay que tener en cuenta que algunos sueros con concentraciones elevadas de ANA pueden mostrar

el llamado “fenómeno de zona” que produce una reacción falsamente negativa si se analiza sólo con una dilución inicial baja (Chabanne et al., 1995).

Títulos tan bajos como 1:10 se han considerado positivos por parte de algunos autores (McVey y Shuman, 1991). En perros con LES, Halliwell y Gorman (1989) determinaron que un título era significativo a partir de 1:100 o superior usando células Hep-2. En otros estudios, títulos de 1:20 usando cortes de hígado de rata como substrato (Shull et al., 1983) y de 1:10 usando células Hep-2, se consideraban significativos (McVey y Shuman, 1991). Otros autores consideran significativos títulos de 1:20 en hígado de rata por su menor sensibilidad (Halliwell, 1982), mientras que en células Hep-2, afirman que perros normales pueden tener títulos incluso superiores a 1:100.

El trabajo de Hansson et al. (1996) contrasta con las recomendaciones de otros autores que consideran significativas diluciones de 1:20-1:30 o incluso menores empleando cortes de hígado de rata. El título tan elevado de 1:100 establecido por estos autores puede deberse a diferencias en la técnica o por la disponibilidad de reactivos y equipamiento más sensibles.

En niños sanos se demostró que usando un título de 1:40 como positivo, el porcentaje de sueros positivos era sólo del 0,4%

comparado con el 2% y 1,6% obtenidos cuando se consideraban positivos títulos de 1:5 y 1:10 respectivamente empleando células Hep-2 como substrato (Arroyave et al., 1988).

Patrones de inmunofluorescencia

Desde el inicio de las pruebas de FANA, era evidente que los diferentes patrones de fluorescencia observados estaban relacionados con la diferente especificidad antigénica de los ANA (Tabla 3). Tanto, que las pruebas de inmunofluorescencia servían para claramente localizar los auto-antígenos en el núcleo, nucleolo o citoplasma. No obstante, este principio no siempre se cumple. Hay que tener en cuenta que algunos antígenos nucleares no-histónicos son altamente solubles en soluciones buffer fisiológicas. Los mejores ejemplos son las ribonucleoproteínas nucleares (nRNP) y el antígeno SS-B, que fácilmente se eluyen del núcleo durante los procesos de lavado. Por tanto, las muestras con ANA frente a nRNP y SS-B pueden a veces resultar negativas (Tan, 1982; Kass et al., 1985).

Sin embargo, en la mayoría de casos los patrones de inmunofluorescencia no son lo suficientemente específicos como para ser clínicamente útiles. Además, los patrones mixtos compuestos por dos o más patrones son frecuentes, pues enfermedades como el LES, esclerosis sistémica y otra variedad de síndromes aparecen clínicamente superpuestos y están asociados con la presencia de múltiples auto-anticuerpos. Sin embargo, en una serie de

circunstancias concretas los patrones pueden ser muy útiles. Por ejemplo, los anticuerpos para ADN-dc o histonas están asociados con un patrón homogéneo (Astion et al., 2000).

Como en el hombre, se ha intentado utilizar el patrón de inmunofluorescencia para ayudar en el diagnóstico diferencial de enfermedades del tejido conectivo en perros. En suero canino, se han descrito tres patrones de fluorescencia sobre cortes de hígado de rata: moteado, homogéneo y anular. En muchas muestras, el patrón es mixto o no pudo ser identificado. No se detectó el patrón nuclear en ningún suero positivo (Bell et al., 1997).

La fiabilidad de los patrones depende del tipo de substrato empleado (Fritzler, 1992). En personas, las células Hep-2 permiten reconocer hasta un total de 30 patrones diferentes de inmunofluorescencia asociados a unos 100 auto-anticuerpos diferentes (Bradwell et al., 1995). A primera vista, parece una ventaja emplear un substrato más bien inespecífico como las células Hep-2 para una prueba diagnóstica.

Antígeno	Patrón Hep-2	Enfermedad
ds-NA	Nuclear homogéneo	LES; AR
ss-DNA	Negativo	LES
Histonas	Nuclear homogéneo	LES; AR
Sm	Nuclear granular basto	LES
U1-snRNP	Nuclear granular grueso	LES; SScl
SS-A	Nuclear granular fino	LES; SS; P/D; AR
SS-B	Nuclear granular fino	LES; SS; P/D; AR
Ribosomal RNP	Citoplasmático denso + homogéneo nucleolar	LES; AR
PCNA	Pleomórfico nuclear	LES
Ku	Nuclear homogéneo con nucleolar homogéneo	LES; SScl; SS; P/D
hmRNP proteína A1	Nuclear granular grueso	LES
DNA topoisomerasa 1 Scl-70	Nuclear homogéneo y nucleolar granular	SScl
Centrómero	Nuclear granular individual	SScl
PM-Scl	Nuclear homogéneo con nucleolar homogéneo	SScl; P/D
RNA-polimerasa 1	Nucleolar granular	SScl
RNA-polimerasa 11	Moteado nuclear + homogéneo. cromatina en metafase	SScl
Fibrillarina	Nucleolar grumoso (U3snRNP)	SScl
NOR	Nucleolar granular	SScl; SS
Mitocondrial	Citoplásmico granular	SScl; Hepatopatías
Centrómero	Huso mitótico	SScl
p80-coilina	Nuclear puntiforme	SS; Hepatopatías
NuMA	Nuclear aparato mitótico	SS
Ki/SL	Nuclear granular	SS
tRNA-sintetasas (Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, KJ)	Citoplásmico granular fino	P/D
Mi-2	Nuclear granular fino	P/D
SRP	Difuso citoplásmico	P/D
Citoqueratina	Fibrilar citoplásmico	AR
Tropomiosina	Fibrilar citoplásmico	AR; Hepatopatías
Vimentina	Vimentina	Hepatopatías
sp -100	Puntos nucleares múltiples	Hepatopatías
Lamininas	Membrana nuclear	Hepatopatías
Complejo poro nuclear	Poros nucleares	Hepatopatías
Actina de músculo liso	Actina	Hepatopatías

Tabla 3.- ANA y los patrones de fluorescencia que producen en células Hep-2. AR: artritis reumatoide; SS: síndrome de Sjogren; SScl: esclerosis sistémicas; P/D: poliomiocitis/dermatomiocitis (Bradwell et al., 1995).

Sin embargo, su falta de especificidad antigénica favorece su empleo como una técnica de *screening* debido a su gran sensibilidad. Además, los patrones aportan una información cualitativa muy importante sobre la especificidad de los ANA de la muestra y permite por tanto plantear pruebas más específicas para la identificación y cuantificación precisa de los ANA (Bradwell et al., 1995).

La especificidad y significado de los anticuerpos detectados todavía no se conoce exactamente. La utilidad del test podría ser mayor si se estableciera una correlación entre el patrón de fluorescencia y unos síntomas particulares en los perros afectados (Bell et al., 1997).

Empleando células Hep-2 como substrato, se pueden identificar los siguientes patrones de inmunofluorescencia en el perro (Laboratorios INOVA, información técnica):

- .- **Homogéneo**: una tinción sólida del núcleo con o sin enmascaramiento aparente de los nucleolos.
 - .- Antígenos nucleares: ADN-dc, ADN, histonas.
 - .- Enfermedades asociadas: títulos altos LES; títulos bajos LES y otras enfermedades conectivas.

.- **Periférico**: tinción sólida, principalmente alrededor de la región externa del núcleo, con tinción más débil alrededor de la región interna del núcleo y hacia el centro del núcleo.

.- Antígenos nucleares: ds-DNA, ss-DNA, DNP, histonas.

.- Enfermedades asociadas: títulos altos LES; títulos bajos LES y otras enfermedades conectivas.

.- **Moteado**: tinción con aspecto granular del núcleo generalmente sin tinción de los nucleolos.

.- Antígenos nucleares: Sm, RNP, Scl-70, SS-A, SS-B, otros aún sin caracterizar.

.- Enfermedades asociadas: títulos altos LES (anticuerpo Sm), enfermedades conectivas mixtas (anticuerpo RNP), escleroderma (anticuerpo Scl-70), o síndrome de Sjögren (anticuerpo SS-B); títulos bajos pueden ser indicativos de otras enfermedades conectivas.

.- **Nucleolar**: tinción granular gruesa o basta dentro del núcleo, generalmente menos de 6 puntos de tinción dentro del núcleo, puede haber algunas zonas de tinción de grano fino de forma ocasional.

.- Antígenos nucleares: ARN y otros antígenos nucleares desconocidos.

.- Enfermedades asociadas: títulos altos son prevalentes en escleroderma y síndrome de Sjögren.

.- **Centrómero**: tinción granular individual. Los puntos teñidos están muy separados y normalmente son un múltiplo de 46.

.- Antígenos nucleares: centrómero de los cromosomas (quinetocoro).

.- Enfermedades asociadas: muy sugestivo del síndrome CREST de esclerosis sistémica progresiva.

.- **Mitocondrial**: moteado individual del citoplasma respetando relativamente el área nuclear.

.- Antígenos nucleares: varios tipos de antígenos mitocondriales.

.- Enfermedades asociadas: títulos altos indican cirrosis biliar primaria.

LEISHMANIOSIS CANINA

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos difásicos del género *Leishmania* y que afecta tanto a personas como animales salvajes y domésticos (Slappendel y Ferrer, 2000). El perro se considera uno de los principales reservorios de leishmaniosis en personas, pero la incidencia de leishmaniosis humana suele ser baja incluso en países con un índice de infección alto en perros (Alvar et al., 1995; Slappendel y Ferrer, 2000). En España la seroprevalencia canina es del 3-7% frente a 0,3-1,2 por cada 100.000 habitantes en personas (Hernández y Martínez-Moreno, 1992; Alvar et al., 1995). No obstante, hay trabajos en nuestra región que han registrado tasas de seroprevalencia tan altas como el 15,18 y 31,91% (Lozano-Maldonado et al., 1992; Morillas et al., 1992). En general puede decirse que oscila entre 4,2 y 39,5% para toda la Península y Baleares (Hernández y Martínez-Moreno, 1992; Gallego-Berenguer, 1992). Los estudios más recientes empleando la técnica de PCR muestran prevalencias mucho más elevadas pues la mayoría de animales tienen contacto con el parásito aunque una proporción significativa no desarrolla la enfermedad (Solano-Gallego et al., 2011).

En España la incidencia anual de leishmaniosis humana es de 100-200 casos, muy baja comparada con los aproximadamente 8000 casos diagnosticados en perros anualmente. Ante esta diferencia de

cifras, se entiende que en la actualidad un gran número de perros, bien controlados, puedan y deban ser tratados sin que existan razones objetivas que aconsejen actuar de otra manera desde un punto de vista sanitario (Semiao-Santos et al., 1995; Tesouro et al., 1995).

El tratamiento de los perros infectados se ha demostrado como una medida eficaz para reducir la prevalencia de la enfermedad. En un estudio realizado en la Isla de Elba, las medidas de diagnóstico y tratamiento de los perros infectados consiguieron reducir la prevalencia en 2/3 partes después de 2 años (Gradoni et al., 1988). Sin embargo, los intentos de eliminar la enfermedad a través del sacrificio de los animales infectados han sido ineficaces (Dietze et al., 1997; Ashford et al., 1998; Noli, 1999), tal vez por la existencia de otros animales portadores y en el caso de la leishmaniosis visceral humana por el propio papel de portador que el hombre puede desempeñar (Dietze et al., 1997). No obstante, la eliminación de perros seropositivos sí redujo la tasa de transmisión entre animales y la incidencia de la enfermedad en niños de menos de 15 años (Ashford et al., 1998).

ETIOLOGÍA Y PATOGENIA

Las leishmanias son protozoos parásitos difásicos que completan su ciclo en dos hospedadores, un vertebrado (cánidos, félidos, roedores, humanos) y un insecto (flebotomos) (Kontos y Koutinas, 1993; Laruelle-Magalon y Toga, 1996). El género *Leishmania* se divide en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* en función de su

desarrollo en moscas del género *Phlebotomus*. Dentro de cada subgénero existen diferentes especies y sub-especies (Slappendel y Ferrer, 2000).

En Europa, la especie infectante es *L. infantum* aunque tal vez también participe *L. tropica*. Ambas especies existen en el área mediterránea y no se diferencian morfológicamente. Al parecer los perros infectados con *L. tropica* son asintomáticos o sólo presentan lesiones cutáneas pequeñas que no se detectan con facilidad (Slappendel y Ferrer, 2000). *L. infantum* se encuadra dentro del complejo *L. donovani* (Slappendel y Ferrer, 2000). En la actualidad, la clasificación se basa sobre todo en la diferenciación por métodos bioquímicos y patrones especiales de isoenzimas llamados zimodemos. El principal zimodemo en nuestra región es el MON-1 (Martín-Sánchez et al., 1994).

En el hombre, la leishmaniosis se divide en cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV), cada forma causada por diferentes especies de leishmania. En el perro, la leishmaniosis debe clasificarse como viscerocutánea porque realmente existe siempre tanto afección visceral como cutánea (Slappendel y Ferrer, 2000).

Aunque desde el punto de vista antropocéntrico el perro pueda ser el vector principal, el hospedador verdadero de *L. infantum* es el zorro, el lobo y el chacal (Bray, 1974; Hommel, 1978). Las tasas de

infección en zorros son iguales a las encontradas en perros y serían los principales reservorios selváticos (Alvar et al., 1995). Concretamente, en una zona de Italia se encontraron tasas de seroprevalencia en zorros de hasta el 18%, aunque sólo 50 zorros pudieron ser estudiados, un número relativamente bajo (Mancianti et al., 1994). El perro adquiriría la infección desde estos hospedadores salvajes. También se han descrito infecciones por *L. mexicana* en gatos (Barnes et al., 1993). Por el contrario, otros animales, como las cabras son totalmente resistentes a la infección tanto de forma natural, a través del flebotomo, como de forma experimental (Anjili et al., 1994).

A pesar de existir cierta controversia, parece que la enfermedad es transmitida exclusivamente por la picadura de la hembra de *Phlebotomus*. Se considera también que el organismo nunca es transmitido por los flebotomos de hombre a hombre (Bray, 1974). En nuestra región, *P. perniciosus* es la única especie vectora, mientras que *P. ariasi* se distribuye por regiones más húmedas (Morillas et al., 1992; Alvar et al., 1995). No obstante, se han identificado hasta 9-10 especies de flebotomos en la península y baleares (Gallego-Berenguer et al., 1992; Gállego-Culleré, 1997). Su distribución geográfica queda comprendida entre los 30° de latitud S y 50° de latitud N, especialmente en climas cálidos, tropicales y mediterráneos (Gállego-Culleré, 1997). *P. perniciosus* es una especie zooantropofílica, que según la mayoría prefiere marcadamente al perro respecto al humano, aunque en algunos trabajos se ha visto que tiene igual preferencia

entre humanos y perro (Alvar et al., 1995). El periodo de actividad es muy variable, oscila entre abril y noviembre, su actividad es crepuscular, siempre y cuando la temperatura sea mayor de 17-18°C y no haya lluvia y sobre todo viento. Las poblaciones presentan un pico difásico, con un pico de mayor densidad en julio y otro aún mayor en septiembre (Alvar et al., 1995; Gállego-Culleré, 1997).

La leishmania sólo puede sobrevivir en el interior de los macrófagos (Mauel, 1996). El ciclo del parásito empieza cuando un flebotomo hembra se alimenta y adquiere los amastigotes de un animal infectado. La duración del ciclo en el interior de la mosca es variable y se ha estimado entre 4 y 20 días. A partir del quinto día pueden encontrarse números significativos de promastigotes metacíclicos con alta motilidad y localizados en la luz del intestino medio y anterior, en una posición que facilita su transmisión (Bates, 1994). Los promastigotes introducidos en la piel de un nuevo hospedador se transforman rápidamente en amastigotes que de forma pasiva esperan a ser fagocitados por los macrófagos para penetrar en su célula hospedadora (Mauel, 1996). La interacción entre el macrófago y el parásito es compleja pero parece que una glicoproteína y un glicolípidos de la membrana del protozoo son los responsables de su unión a la membrana del macrófago (Ferrer, 1994). El mecanismo de entrada tiene importantes implicaciones pues determina la respuesta de la célula frente a la partícula fagocitada (Mauel, 1996). Los macrófagos disponen de receptores para la fracción Fc de inmunoglobulinas,

fracciones C3b y C3bi del Complemento, lectinas e integrinas (Blackwell et al., 1985; Mauel, 1996). Los parásitos son capaces de activar la fracción C3 del complemento (vía alterna) pero una vez fijada la fracción C3 sobre la superficie del amastigote, es transformada en C3bi (inactiva) por acción de una glicoproteína, Gp63, que tiene actividad proteasa. Una vez unido al fragmento C3bi, se une a los receptores para esta fracción que los macrófagos presentan. Se ha demostrado que este paso es necesario, pues la adición de un Ac anti-C3 bloquea esta fase e impide el paso intracelular del parásito (Bourdeau, 1988; Puentes et al., 1989; Varela y Valladares, 1997). Los amastigotes inoculados directamente no son infectivos pero producen la formación de Ac específicos y el perro se hace seropositivo (Leandro et al., 2001).

Los amastigotes, tanto libres como en el interior de los macrófagos, se distribuyen por todo el organismo, especialmente la médula ósea y otros órganos hematopoyéticos, donde continúan multiplicándose. Desde estos puntos de multiplicación, los amastigotes se diseminan a otros órganos, sobre todo la piel, hígado, adrenales, páncreas, riñones, tracto digestivo, ojos, testículos, hueso y articulaciones (Ferrer, 1994).

Los signos clínicos pueden presentarse en un periodo de 3 meses a siete años después de la infección (Slappendel y Ferrer, 2000). En animales infectados experimentalmente, el periodo de

incubación oscila entre 2 y 12 meses, aunque se ha demostrado la existencia de formas subclínicas durante 25 meses (Alvar et al., 1995). En una serie de casos descrita en Holanda, los síntomas aparecieron incluso 5-7 años después de que el perro había viajado a zonas endémicas (Slappendel, 1988). En un grupo de perros sometidos a infección natural durante los meses de mayo a septiembre, las primeras lesiones no aparecieron hasta noviembre-febrero (Vidor et al., 1991).

Los síntomas y lesiones de la parasitación están producidos por dos mecanismos principales: la producción de una inflamación no-supurativa asociada a la presencia del parásito y la producción de CIC que se depositan en glomérulos renales, vasos sanguíneos y articulaciones. Los granulomas inflamatorios crónicos son los responsables de las lesiones cutáneas, hepáticas, entéricas, óseas y parte de las oculares y renales. Los depósitos de CIC son los responsables del desarrollo frecuente de glomerulonefritis, parte de las lesiones oculares y de la vasculitis (Ferrer, 1994).

RESPUESTA INMUNE

Leishmania sp. es un parásito obligado y la defensa del hospedador depende fuertemente de la actividad de los linfocitos T (Kontos y Koutinas, 1993). Estudios de leishmaniosis en ratones indican que la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad se asocia con el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 o Th2 respectivamente.

En la respuesta Th1, se produce IFN- α , el más potente activador de macrófagos conocido, TNF- α , factor de estimulación de granulocitos-macrófagos (GMCSF), IL2, IL3 y IL12, que tienen un efecto protector, mientras que la respuesta Th2 se asocia con un aumento en la producción de IL4, IL5, IL6, IL9 y IL10 que determinan la susceptibilidad a la infección. Un patrón similar de citocinas parece existir en el perro (Locksley et al., 1991; Deplazes et al., 1995; Slappendel y Ferrer, 2000).

En un modelo experimental de leishmaniosis donde se estudió la respuesta inmune (Killick-Kendrick et al., 1994), se llegó a la conclusión de que los perros podían responder de dos formas diferentes a la infección. Una inmunidad celular, que se asocia con infecciones inaparentes y una inmunidad humoral, no protectora, caracterizada por anticuerpos circulantes en altas concentraciones y que indican susceptibilidad a la infección y desarrollo de sintomatología. Unos pocos perros parecían desarrollar una respuesta intermedia. Inicialmente mostraban títulos altos que después caían, quizás al mismo tiempo que se desarrollaba una respuesta inmune celular. Estos perros nunca mostraban síntomas de la enfermedad. Otros pocos perros parecían ser resistentes inicialmente, desarrollando una respuesta inmune celular que eventualmente fracasaba y era seguida por elevación de título de Ac específicos y desarrollo de síntomas. La respuesta no dependía del número de parásitos

inoculados y posiblemente está determinada genéticamente (Killick-Kendrick et al., 1994).

Al igual que para los linfocitos T *helper* (CD4+), existe una dicotomía similar en el patrón de producción de citocinas para los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Pinelli et al. (1994) demostraron que algunos perros son capaces de generar líneas de células T citotóxicas capaces de desarrollar actividad citolítica parásito-específica y de producir IFN- γ después de ser estimuladas antigénicamente. Esta línea CD8+ es capaz de lisar los macrófagos infectados con leishmania. Una respuesta inmune similar se ha visto que es importante para otros patógenos intracelulares como toxoplasma (Pinelli et al., 1994; Pinelli et al., 1999).

El IFN- γ es por tanto la citocina fundamental implicada en la eliminación de parásitos intracelulares. El IFN y otras citocinas que están presentes en la respuesta inmune no específica frente al parásito son determinantes en el establecimiento o no de la enfermedad. En un estudio sobre voluntarios de un país libre de leishmaniosis, demostró que esta respuesta inmune no específica, cuando se desarrolla adecuadamente, es capaz de inhibir el crecimiento del parásito y el desarrollo de la enfermedad (Akuffo y Britton, 1992). Sin embargo, la susceptibilidad a estos factores séricos sería diferente según las especies. Es muy acusada en *L. tropica* mientras que *L. donovani* suele ser resistente (Hoover et al., 1984).

En la respuesta Th2 es la IL4 la responsable de una elevación de Ac específicos no protectores, muchos de la subclase IgE (Locksley et al., 1991). Además, el IFN- α es capaz de inducir la presentación de antígenos del MHC de clase II en la superficie de las células presentadoras de antígenos y de bloquear la proliferación de las células Th2 (Locksley et al., 1991; Scott, 1991). La IL4 también bloquea la activación de macrófagos inducida por el IFN- α (Scott, 1991).

La reducción de células T se hace evidente tanto a nivel de ganglios linfáticos como del bazo, órganos donde se produce al mismo tiempo una acumulación de histiocitos conteniendo parásitos y una hiperplasia de células plasmáticas (Brandonisio et al., 1989). Por el contrario, las células B muestran una mayor capacidad para responder a la estimulación policlonal en términos de producción de IgG (Brandonisio et al., 1989). La adenomegalia característica de la enfermedad se debe a la proliferación de células B, células plasmáticas, histiocitos y macrófagos junto a la atracción de eosinófilos (Slappendel y Ferrer, 2000).

La hipergammaglobulinemia es muy marcada pero no es protectora y termina por ser perjudicial. El exceso de Ac puede incluso impedir que las células T eliminen las células infectadas (Miescher y Belehu, 1982). Es probable que los Ac específicos opsonicen amastigotes e incrementen su fagocitosis por los macrófagos, dentro

de los cuales el parásito sobrevive y se multiplica. Sin embargo se sabe también que se producen auto-anticuerpos y CIC que se relacionan con algunos síntomas fundamentales de la enfermedad como la glomerulonefritis y que también se asocian a manifestaciones menos frecuentes como trombocitopenia y anemia inmunomediadas (Slappendel y Ferrer, 2000).

Para que se produzca una respuesta inmune celular es necesaria la atracción de linfocitos y el contacto íntimo entre estas células y el Ag en la superficie del macrófago. Sin embargo, las leishmanias, una vez entran en el macrófago parecen estar protegidas (Garnham y Humphrey, 1985). Sin la ayuda de las células T, los macrófagos son incapaces de lisis los amastigotes (Kontos y Koutinas, 1993).

Como en otras enfermedades parasitarias, en personas con leishmaniosis visceral también se ha demostrado la presencia de un factor sérico supresor de la respuesta inmune. Este factor actúa interfiriendo con la producción de IL-2, esencial para la proliferación de células T, y del IFN- γ (Stern et al., 1988; Barral-Netto et al., 1991). En infecciones por *L. major*, se aisló una proteína del parásito capaz de promover un agravamiento de la enfermedad en ratones. Este agravamiento estaba mediado por células T, demostrándose que esta proteína promovía el desarrollo de una respuesta Th2, con producción

de Ac no protectores y agravamiento de los síntomas (Bogdan et al., 1990).

Muchos síntomas de leishmaniosis son consecuencia de estas alteraciones del sistema inmune. La sobreproducción de linfocitos B, histiocitos y macrófagos se considera un mecanismo inmune compensatorio que causa linfadenopatía generalizada, hepatoesplenomegalia y una respuesta humoral excesiva. Esta respuesta no es protectora e incluso perjudicial pues los Ac específicos aumentan la diseminación del parásito, los auto-Ac producen anemia y trombocitopenia inmunomediada y los CIC producen vasculitis, glomerulonefritis y poliartritis (Kontos y Koutinas, 1993; Spreng, 1993; Buracco et al., 1997; Varela y Valladares, 1998). Se ha publicado incluso un caso de osteomielitis en un perro con leishmaniosis de 10 meses que respondió al tratamiento con glucantime (Buracco et al., 1997).

En otras formas clínicas como la leishmaniosis mucocutánea humana, los estudios inmunohistoquímicos del infiltrado sugieren que existe un estado de hiper-reactividad inmune. Los linfocitos T, generalmente CD4+, predominan sobre las células B. Es una reacción de hipersensibilidad retardada con predominio de células T de memoria en una lesión de tipo granulomatoso pero desorganizada caracterizada también por la proliferación *in situ* de macrófagos (Bryceson, 1970; Esterre et al., 1994).

SÍNTOMAS GENERALES

La infección por *Leishmania* suele causar una enfermedad sistémica crónica. Los síntomas son muy variables y pueden confundirse con los de otras infecciones crónicas como ehrlichiosis o rickettsiosis. Además, las infecciones mixtas no son infrecuentes (Ciaramella et al., 1997; Slappendel y Ferrer, 2000).

En el momento de la anamnesis, los principales síntomas observados por los propietarios son debilidad, lesiones cutáneas, anorexia y pérdida de peso. Estos síntomas se desarrollan gradualmente. En un pequeño pero significativo porcentaje de perros hay un historial de epistaxis. La hipertermia aparece en aproximadamente un 10% de perros (Ciaramella et al., 1997).

En la exploración física los hallazgos más constantes son linfadenomegalia generalizada (56,7%) o localizada simétrica (32%); palidez de mucosas (58%), y esplenomegalia moderada o grave (53,3%). La pérdida de peso se detecta en un 32% de perros. Las lesiones cutáneas son frecuentes, especialmente una dermatitis descamativa seca (56%), úlceras (40%), alopecia periorbital (18%), alopecia difusa (14%) y onicogriposis (24%). Las lesiones ulcerativas se localizan fundamentalmente en el pabellón auricular (24%) y bordes nasales (18%) (Ciaramella et al., 1997).

En general, las lesiones de la leishmaniosis canina se caracterizan por cambios inflamatorios granulomatosos en múltiples órganos que están asociados con macrófagos parasitados. Los órganos afectados más frecuentemente son la piel, uniones mucocutáneas, ojos, sistema linfático e intestino (Longstaffe y Guy, 1988). Las lesiones nodulares sin ulceración se presentan en un 6% de casos, localizándose sobre todo en la cabeza, miembros, tórax aunque pueden presentarse en cualquier localización. Su tamaño oscila entre 1 a 10 cm. Otras lesiones cutáneas poco frecuentes son granulomas en mucosas como la oral, o en el pene (Denerolle, 1996; Font et al., 1996). Algunos síntomas descritos en la leishmaniosis canina pero poco frecuentes e inespecíficos son pirexia persistente (4%), ascitis, diarrea y poliuria-polidipsia. Los síntomas oculares se presentan en un 16% de perros. En raras ocasiones, los animales sólo muestran síntomas de fallo renal crónico (Ciaramella et al., 1997). La forma aguda aparece en menos del 5% de perros y se caracteriza por fiebre, linfadenomegalia y ausencia de lesiones cutáneas (Ciaramella et al., 1997). Se ha descrito fiebre periódica con picos ocasionales de 40 a 40,5°C (Keenan et al., 1984a).

En una serie de 80 casos descrita por Slappendel (1988), los porcentajes de presentación de cada síntoma fueron algo diferentes y sobre todo muy variados. Los síntomas por orden de frecuencia fueron fatiga, pérdida de peso, somnolencia, polidipsia, anorexia, diarrea, vómitos, polifagia, epistaxis, melena, estornudos, tos y síncope. Los

hallazgos del examen físico, también según la frecuencia de presentación, fueron linfadenopatía, lesiones cutáneas, caquexia, trastornos locomotores, hipertermia, conjuntivitis, esplenomegalia, onicogriposis, rinitis, queratitis, neumonía, ictericia, uveitis y panoftalmítis (Slappendel, 1988). Los principales síntomas de la leishmaniosis canina han sido resumidos en un trabajo de revisión por Noli (1999) (Tabla 4).

Linfadenopatía simétrica	71,2-96,1
Lesiones cutáneas	75-89
Mucosas pálidas	58-94,2
Pérdida de peso	30,7-70
Pirexia	23-70
Letargia	18-70
Anorexia	18-70
Esplenomegalia	15-53,3
Insuficiencia renal	16-32
Lesiones oculares	16-50
Epistaxis	10-37
Artropatías	4-6,4
Insuficiencia renal grave sin otros síntomas	4
Leishmaniosis aguda: fiebre, linfadenopatía	4

Tabla 4.- Incidencia relativa (%) de los diferentes síntomas de leishmaniosis cutánea (sólamente síntomas con incidencia >4%) (Noli, 1999).

Como manifestaciones sistémicas poco frecuentes de la leishmaniosis canina se han citado una enteritis hemorrágica aguda fatal, osteoartritis de la tercera falange y de varias articulaciones (Denerolle, 1996). La relación causa-efecto se estableció únicamente en base a la presencia de amastigotes en la reacción inflamatoria (Denerolle, 1996). También se ha descrito una colitis crónica como síntoma fundamental de la infección y diagnosticada por la presencia de macrófagos con amastigotes fagocitados en biopsias de colon (Ferrer et al., 1991). Sin embargo, como los mismos autores indican, el tipo de infiltrado encontrado es similar al presente en otros tipos de colitis crónica. Sería la presencia del parásito el único motivo para pensar que la colitis era producida por la leishmania. Sólo uno de los perros se trató y la colitis mejoró con el tratamiento de leishmania.

Las lesiones cutáneas son variables y habitualmente las más llamativas de la enfermedad (Ferrer et al., 1988). De acuerdo con las lesiones macroscópicas y microscópicas se establecieron 4 formas cutáneas diferentes a partir de 43 perros con leishmaniosis: alopecia y descamación, dermatosis ulcerativa, enfermedad nodular generalizada y enfermedad pustular generalizada (Ferrer et al., 1988). La alopecia y descamación se apreció en el 60% de perros, las lesiones eran simétricas, afectando especialmente la cara. La dermatosis ulcerativa afectó al 23% de animales. Las úlceras se sitúan fundamentalmente en las extremidades sobre las articulaciones. La forma nodular se presentó en un 12% de animales como múltiples nódulos no ulcerados con un diámetro que osciló desde 1 mm hasta 10 cm. La dermatitis

pustular se presentó solo en dos perros con pústulas estériles sin acantolisis. No había parásitos dentro de la pústula pero sí en la dermis próxima. Esta forma pustular es controvertida. Para algunos autores (Ferrer et al., 1986, Denerolle, 1996) aparece en un reducido número de casos, los cultivos a partir de pústulas son estériles y las biopsias muestran la presencia de leishmanias (Denerolle, 1996). Sin embargo, los cultivos bacterianos a partir de material purulento pueden ser negativos en ocasiones, y además la asociación de leishmania con pénfigo foliáceo ha sido descrita en varios casos (Ginel et al., 1993). Esto parece especialmente probable pues según describe Denerolle (1996), tales pústulas se caracterizan por acantolisis y por la presencia de leishmanias en macrófagos de la dermis, una imagen que ha sido descrita en perros con leishmaniosis y pénfigo foliáceo (Ginel et al., 1993). Otros autores opinan que no existe tal forma pustular (Ciaramella et al., 1997).

La forma nodular se corresponde con una acumulación densa de macrófagos en la dermis. En estos animales, la enfermedad no se restringe a la piel. Pueden encontrarse también amastigotes en médula ósea y se desconoce la causa de que cierto número de parásitos desarrolle este tropismo cutáneo y se acumule en un punto concreto de la piel desarrollando una fuerte reacción inflamatoria granulomatosa (Ferrer et al., 1988; Ferrer et al., 1990). Posiblemente, el gran acúmulo de parásitos dentro de macrófagos y células multinucleadas gigantes se deba a una respuesta inmune muy poco eficaz (Ferrer et al., 1988).

En una serie de 22 perros con leishmaniosis y lesiones cutáneas, la forma más frecuente fue una dermatitis exfoliativa (90,9%), seguida de ulceraciones (63,6%), onicogriposis (54,5%), dermatitis pustular estéril (13,6%) y paroniquia (13,6%) (Koutinas et al., 1993). La diversidad de lesiones cutáneas parece estar relacionada con la respuesta inmune del hospedador. Al igual que en el hombre, histológicamente el perro puede desarrollar una dermatitis alopécica, nódulos cutáneos o una respuesta granulomatosa destructiva con la formación de úlceras (Fondevila et al., 1997). El grado de competencia epidérmica influye sobre la activación preferencial de células Th1 y Th2. El procesado y presentación de los antígenos de leishmania parece ser más eficiente en las lesiones cutáneas caracterizadas por alopecia que en la forma nodular, donde un gran número de macrófagos cargados de parásitos se acumula en la dermis, quizás debido a una ausencia de estimulación de células T por las células de Langerhans y queratinocitos MHC II positivos. En las lesiones ulcerativas, hay ausencia de células Langerhans pero existen queratinocitos MHC II positivos (Fondevila et al., 1997; Lira et al., 1997).

El llamado chancro de inoculación aparece en zonas de poco pelo como la trufa, cara interna del pabellón auricular y abdomen. Otras lesiones cutáneas menos frecuentes son la aparición de dermatitis liquenoide psoriasiforme, depigmentación sin ulceración de la trufa e incluso de los labios imitando las lesiones de vitiligo

(Denerolle, 1996). También se han descrito dos casos de dermatofibrosis nodular confirmada histológicamente, donde las lesiones desaparecieron después de tratar la leishmaniosis (Denerolle, 1996).

Aunque la linfadenopatía generalizada periférica es un hallazgo frecuente, los linfonodos pueden ser pequeños en una alta proporción de casos avanzados, especialmente aquellos que sufren insuficiencia hepática o renal (Kontos y Koutinas, 1993). La hepatoesplenomegalia, casi patognomónica en la leishmaniosis humana, es poco frecuente en el perro (Kontos y Koutinas, 1993).

Entre las poliartritis no erosivas más frecuentes del perro se encuentran las poliartritis reaccionales también llamadas post-infecciosas, que son consecuencia del depósito de inmunocomplejos y no están asociadas a la presencia de un foco infeccioso articular (Chabanne et al., 1995). En esta categoría se incluyen las artritis asociadas a leishmaniosis, ehrlichiosis, borreliosis y brucelosis en el perro (Chabanne et al., 1995).

Los síntomas locomotores de la leishmaniosis canina son poco frecuentes y se manifiestan por cojeras intermitentes, alternantes y recurrentes, poliartritis, polimiositis y lesiones óseas. Estos síntomas se atribuyen al depósito de CIC en la membrana sinovial (Kontos y Koutinas, 1993; Spreng, 1993; Buracco et al., 1997; Varela y

Valladares, 1998; Vamvakidis et al., 2000). Los análisis del líquido sinovial en perros con poliartritis han demostrado su naturaleza inflamatoria y la presencia de amastigotes. Las lesiones histopatológicas son similares a las encontradas en la poliartritis del LES y otras poliartritis inmunomediadas (Spreng, 1993). En algunos casos los amastigotes sólo pueden detectarse en biopsias de la membrana sinovial pero los títulos de Ac específicos son positivos e incluso superiores a los séricos (Varela y Valladares, 1998). En algunos perros se han encontrado procesos perióísticos osteolíticos en diversas partes del esqueleto (Slappendel y Ferrer, 2000).

La inmunosupresión del animal promueve la aparición de infecciones concurrentes y enfermedades inmunomediadas, todo lo cual dificulta el diagnóstico de leishmaniosis y en ocasiones conduce a un sobre-diagnóstico de la enfermedad especialmente en áreas endémicas. La mayoría de estas manifestaciones menos comunes se consideran por lo general producidas por enfermedades concurrentes (Slappendel y Ferrer, 2000). El cuadro clínico puede complicarse con demodicosis (Keenan et al., 1984a; Mozos et al., 1999), pioderma, neumonías, alteraciones gastrointestinales, etc. Como manifestaciones poco frecuentes o enfermedades concurrentes con leishmania se han descrito taponamiento pericárdico, colitis crónica, pénfigo foliáceo (Longstaffe et al., 1983; Ginel et al., 1993), poliartritis, alteraciones de la coagulación, hemangiosarcoma (Margarito et al., 1994) y otras

neoplasias (Macri et al., 1987); dermatomiositis (Macri y Guarda, 1987) y síndrome nefrótico (Slappendel y Ferrer, 2000).

Laboratorialmente, la leishmaniosis canina se caracteriza por anemia (21 a 60%), hiporregenerativa y a menudo normocítica y normocrómica. La trombocitopenia aparece en hasta un 29,3 % de casos y otro 24% muestran leucocitosis con neutrofilia absoluta. La elevación de las proteínas totales séricas es otra alteración biopatológica frecuente (63,3%) y electroforéticamente se caracteriza por hipoalbuminemia (68%) e hiperglobulinemia moderada o grave (70,6%). La hiperproteinemia es muy frecuente aunque las alteraciones de la proteinemia no están presentes en todos los perros en el momento del diagnóstico. Martínez-Cruz et al. (1992) encontraron las alteraciones clásicas del proteinograma en 87,9% de perros y puede llegar a ser tan importante que se confunda con mieloma. La electroforesis muestra disminución de la albúmina y elevación de las globulinas beta y gamma (Denerolle, 1996). Las β -1 y β -2 aumentan las primeras, seguidas de las β -3 y gamma-globulinas lo que permite, según esta progresión, determinar el tiempo de evolución de la enfermedad (Martínez-Cruz et al., 1992; Denerolle, 1996; Noli, 1999).

Finalmente, se pueden encontrar aumentos moderados en la actividad sérica de enzimas hepáticas (ALT, ALP, GGT) pero sólo en un 16% de perros (Ceci et al., 1985; Ciaramella et al., 1997) y con carácter muy variable (Martínez Moreno et al., 1992). La leucopenia

descrita por Slappendel (1988) parece no estar presente según los resultados de otros autores (Martínez Moreno et al., 1992; Denerolle, 1996; Ciaramella et al., 1997). Las principales alteraciones biopatológicas han sido revisadas por Noli (1999) (Tabla 5).

Alteraciones laboratoriales	Prevalencia
Hiperglobulinemia	70-100
Tasa albúmina/globulina baja	76
Hipoalbuminemia	68-94
Proteínas séricas totales altas	63,3-91
Anemia normocítica normocrómica hiporregenerativa	21-94,2
Leucopenia	22
Leucocitosis con desviación izquierda	8-24
Trombocitopenia	29,3-50
Azotemia y creatininemia	38-45
Aumento de las enzimas hepáticas	16-61
Proteinuria	29-91
Prueba ANA positiva	31-47
Prueba de Coomb's positiva (débil)	10-84

Tabla 5.- Hallazgos de las pruebas de laboratorio clínico en perros con leishmaniosis (Noli, 1999).

Finalmente, también pueden aparecer síntomas de alteraciones en la hemostasis. La epistaxis, diarrea hemorrágica y la hematuria no

son infrecuentes, y deben interpretarse como manifestaciones de una hemostasis alterada (Valladares et al., 1998). La hemostasis en perros con leishmaniosis se ha estudiado antes y después del tratamiento. Antes del tratamiento se encontró trombocitopenia moderada, reducción en la agregación plaquetaria colágeno-inducida, prolongación del tiempo de protrombina y aumento de los productos de degradación del fibrinógeno/fibrina. Todos los parámetros hemostáticos recuperaron la normalidad después del tratamiento. Los resultados de este trabajo sugieren que la infección induce el desarrollo de CID. En las fases iniciales y mientras se mantiene compensada, esta hipótesis es compatible con unas concentraciones de fibrinógeno y valores de PT y APTT normales (Valladares et al., 1998). La trombocitopenia puede estar asociada con la gammapatía, tal y como se ha descrito en enfermedades como la ehrlichiosis canina (Valladares et al., 1998). Sin embargo, la trombocitopenia producida por *L. infantum* en 44 de 150 perros fue casi siempre superior a 50×10^4 /microl, menos marcada que en infecciones por ehrlichia (Ciaramella et al., 1997).

ALTERACIONES RENALES

La insuficiencia renal crónica es la causa más frecuente de muerte en perros afectados de leishmaniosis (Benderitter et al., 1988; Slappendel, 1988; Macri y Conte, 1989; Poli et al., 1991). La prevalencia de insuficiencia renal subaguda o crónica en perros con

leishmaniosis se ha estimado en un 23% (Naskidachvili y Peroux, 1988; Denerolle, 1996).

Las lesiones renales de las leishmaniosis humana y canina son similares pero su patogenia no se ha elucidado completamente. Existen ahora evidencias de que la inmunidad celular participa en la patogenia de la glomerulonefritis inmunomediada. En una investigación sobre la participación de células T CD8(+) y CD4(+) en la nefropatía de la leishmaniosis canina, se demostró la presencia de un infiltrado con predominio de células CD4(+) tanto en los glomérulos como en el intersticio de 4 de 6 animales estudiados, Las células CD8(+) se detectaron sólo en un animal y siempre acompañadas por células CD4(+). Esto se repitió en todas las formas de glomerulonefritis. El Ag de leishmania se detectó en los glomérulos y en el infiltrado inflamatorio intersticial de los 4 perros. En conclusión, tanto las células T como las Ig participan en la patogenia de las lesiones (Costa et al., 2000).

En hamsters infectados por *L. donovani*, se produce una glomerulonefritis mesangial proliferativa correlacionada con la presencia de antígenos de leishmania, CIC y depósito progresivo de sustancia amiloide (Oliveira et al., 1985). Los CIC están formados por antígenos del parásito e Ig del hamster (Oliveira et al., 1985). En un trabajo posterior, el mismo grupo de investigación estableció que los CIC estaban formados por IgG1, IgG2, IgA e IgM. Estos resultados se

obtuvieron a partir de los eluidos de los riñones de los hamsters infectados (Sartori et al., 1991).

Una glomerulonefritis y una nefritis tubulointersticial se consideran las dos principales patogenias responsables de la aparición de proteinuria asintomática, del síndrome nefrótico y del fallo renal crónico que suelen aparecer en la leishmaniosis canina (Benderitter et al., 1988; Mancianti et al., 1989; Poli et al., 1991; Koutinas et al., 1994). La histopatología de las lesiones se ha estudiado ampliamente. En una serie de 14 perros con leishmaniosis, que presentaban proteinuria con o sin otros síntomas de lesión renal, las lesiones renales se caracterizaron por glomerulonefritis membranoproliferativa generalizada en 6 de ellos (43%). Otras formas de lesión renal encontradas fueron glomerulonefritis mesangioproliferativa (21%), glomerulonefritis membranosa (29%), nefritis tubulointersticial y glomerulosclerosis (7%) (Koutinas et al., 1994). Las lesiones glomerulares son mucho más importantes y destacadas que las lesiones tubulointersticiales (Koutinas et al., 1994).

La glomerulonefritis membranosa se caracterizó por un aumento de células mensangiales, epiteliales y endoteliales extendiéndose a todo el glomérulo y afectando al 75% de glomérulos. La luz de los capilares glomerulares estaba parcial o totalmente obliterada por el engrosamiento de sus paredes y material PAS-positivo estaba depositado a lo largo de la membrana basal glomerular y en la matriz

mesangial. Debido a esa deposición, la membrana basal tenía aspecto engrosado y el mensangio expandido (Koutinas et al., 1994).

La glomerulonefritis mesangioproliferativa se detectó en 3/14 perros con proteinuria. Había hiper celularidad mesangial. La matriz mesangial estaba engrosada por la deposición de material PAS-positivo. El aspecto de muchos glomérulos era el de masas eosinofílicas amorfas. La adherencia del glomérulo a la capa epitelial parietal de la cápsula de Bowman oblitera el espacio capsular, debido a una combinación de hiperplasia de células parietales en forma de luna creciente y a la fibrosis periglomerular (Koutinas et al., 1994).

La glomeruloesclerosis es la fase final de los 3 tipos de glomerulopatías encontrados en la leishmaniosis canina y suele ser generalizada. En todos los perros con proteinuria se vieron infiltrados linfo-plasmocíticos intersticiales y periglomerulares y con macrófagos en las áreas afectadas. Además, había degeneración vacuolar de las células tubulares y necrosis. La luz de muchos túbulos renales estaba llena de moldes hialinos y granulares con algunas células epiteliales degeneradas (Koutinas et al., 1994).

Poli et al. (1991), en un estudio sobre 34 casos, encontraron que la glomerulonefritis era de tipo mesangioproliferativo en el 62%; y membranoproliferativo en el 35%. En otro estudio sobre 11 perros, el tipo membranoso fue visto en 5 casos, el mesangioproliferativo en 4 y

el membranoproliferativo en 1 caso. En el material depositado se demostró la presencia de IgG, IgM y C3, tanto en las zonas mesangiales como en las paredes de los capilares glomerulares. La conclusión del estudio es que las lesiones tenían un origen inmunomediado.

Las glomerulonefritis por CIC pueden estar causadas tanto por antígenos exógenos como endógenos. Están descritas en enfermedades infecciosas como la ehrlichiosis, babesiosis y leishmaniosis, así como en el LES (Koutinas et al., 1994). La presencia de células plasmáticas intersticiales y periglomerulares se considera una evidencia del origen inmune de las glomerulonefritis de la leishmaniosis canina (Koutinas et al., 1994). El curso crónico de la enfermedad conduce a una antigenemia constante facilitando la formación de CIC. No obstante, Poli et al. (1991) no encontraron ninguna relación entre la concentración periférica de CIC y el grado de glomerulonefritis. Esto puede explicarse porque los CIC sean en algunos casos pequeños y solubles y necesiten un ratio Ag-Ac igual o sólo ligeramente mayor a 1 para depositarse en el glomérulo y producir lesiones. Si esto no se cumple, los CIC pueden ser eliminados por el SMF. Otro factor determinante de su precipitación es la carga eléctrica del Ag y la capacidad de unión del Ac. Todos estos factores pueden explicar que no siempre se produzca glomerulonefritis en los perros con leishmaniosis (Koutinas et al., 1994).

Estas lesiones están presentes incluso cuando los test de función renal son normales o solamente existe proteinuria (Koutinas et al., 1994; Palacio et al., 1997). La proteinuria persistente es un signo casi patognomónico de glomerulopatía. Más precisamente se produce por el daño a la membrana basal, que siempre aparece en los tipos membranoproliferativos y membranoso, aunque puede derivar también de las lesiones tubulares (Koutinas et al., 1994).

Las concentraciones séricas de NUS y creatinina y el aclaramiento de creatinina se usan rutinariamente, pero estos parámetros son útiles cuando la disminución en la tasa de filtración glomerular disminuye más del 75%. Por tanto, carecen de sensibilidad suficiente para detectar un fallo renal precoz (Chew y Dibartola, 1988). Recientemente, se ha demostrado que el cociente proteínas/creatinina en orina es una prueba más sensible para valorar la función renal en la leishmaniosis canina (Palacio et al., 1995).

Las enzimas urinarias parecen ser un indicador más sensible y fiable para la valoración del status renal en perros con leishmaniosis. Se han publicado varios trabajos donde se ha empleado la enzimuria como método de detección de lesiones renales en perros con leishmaniosis. La actividad enzimática de enzimas del borde en cepillo como la alanino aminopeptidasa (AAP), gammaglutamil transpeptidasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP) y las enzimas lisosomiales N-acetyl-beta-D-glucosamidasa (NAG) y beta-glucuronidasa localizadas en los

túbulos contorneados proximales se han valorado en el diagnóstico y pronóstico en la detección de fallo renal precoz en perros con leishmaniosis. Estos trabajos han demostrado cómo las actividades enzimáticas de la GGT, NAG y beta-glucuronidasa eran significativamente superiores en perros enfermos, mientras que no había diferencias significativas en los niveles de NUS y de creatinina (Palacio et al., 1997). No existe correlación entre la concentración de proteínas totales y la de enzimas urinarias (Palacio et al., 1997).

DIAGNÓSTICO

Los síntomas clínicos de leishmaniosis son numerosos y muy variables como se ha descrito previamente. Dependiendo de cada caso, la leishmaniosis canina puede confundirse con otras enfermedades infecciosas, varias dermatosis, neoplasias, enfermedad mielo y linfoproliferativas y endocrinopatías. Lo más difícil es el diagnóstico diferencial con el LES, puesto que cualquier síntoma de leishmaniosis puede ocurrir también en el LES (Slappendel, 1988).

Este diagnóstico diferencial es especialmente difícil en las formas cutáneas, donde incluye a muchas otras enfermedades. Las más destacables son el LES, otras enfermedades autoinmunes de la piel, adenitis sebácea granulomatosa, ehrlichiosis, babesiosis, hepatozoonosis y metástasis tumorales (Kontos y Koutinas, 1993). Por todo esto, en zonas endémicas es necesario ser muy estricto a la hora de diagnosticar la leishmaniosis en base a signos clínicos poco

habituales o exclusivamente en base a una serología positiva (Denerolle, 1996). En otros casos, los animales no desarrollan títulos positivos hasta mucho después de aparecer los primeros síntomas de la enfermedad (Denerolle, 1996). Este fenómeno se ha cuantificado en un 5,6% de casos (Denerolle, 1996).

Pruebas serológicas

Son hasta ahora las más utilizadas y constituyen un grupo amplio que incluye métodos como la fijación del complemento, inmunofluorescencia directa e indirecta, diferentes métodos ELISA, aglutinación directa, Western-blot, etc (Reed et al., 1990; Tesouro et al., 1993; Portus-Vinyeta, 1997; Aisa et al., 1998; Slappendel y Ferrer, 2000).

La serología, en general, presenta una mayor sensibilidad que el examen directo y es de realización mucho más fácil que el cultivo (Portus-Vinyeta, 1997). La inmunofluorescencia indirecta (IFI) ha sido la prueba más utilizada para el diagnóstico serológico, especialmente por su sencillez. El suero o plasma problema se incuba a diferentes diluciones (títulos) sobre un portaobjetos con antígeno fijado, normalmente promastigotes de cultivo. Después de una incubación de 30 minutos y lavado, se añade un conjugado marcado con un fluorocromo y tras otros 30 minutos de incubación y correspondiente lavado el portaobjetos se examina empleando un microscopio de

fluorescencia, determinando la mayor dilución que presenta fluorescencia (Giauffret y Taliercio, 1971; Tesouro et al., 1992). Desde su aplicación, progresivamente ha sido sustituida por técnicas de ELISA que son más prácticas y objetivas.

Inicialmente, las pruebas ELISA tenían el inconveniente de producir resultados heterogéneos. En el caso del ELISA esto ocurre cuando el Ag utilizado es un Ag soluble fijado en placas de poliestireno para microtitulación. Por todo esto, las técnicas más extendidas son las que utilizan el parásito completo como Ag. Este Ag es fácil de estandarizar y contiene todos los epítopes (Portus-Vinyeta, 1997).

La interpretación de resultados es sin duda el punto más conflictivo. Las pruebas serológicas demuestran la presencia de Ac pero no confirman la presencia de enfermedad activa (Slappendel y Ferrer, 2000). La ausencia de Ac específicos no indica necesariamente la ausencia del parásito (Portus-Vinyeta, 1997). No obstante, un título positivo apoya con firmeza el diagnóstico si la clínica es compatible. El problema es definir cuando un título es claramente positivo. En algunos perros con leishmaniosis la producción de Ac puede ser baja y además en un 10-20% de perros seropositivos de apariencia sana el parásito puede eliminarse de forma espontánea sin que desarrollen nunca los síntomas de la enfermedad (Slappendel y Ferrer, 2000). Curiosamente, en algún estudio experimental se comprobó que los perros con títulos más altos tenían menor carga parasitaria. El mayor

número de parásitos se encontró en el hígado (Binbazim et al., 1993). Tampoco se ha demostrado relación entre la gravedad de los síntomas, el título de Ac y el número de parásitos en las biopsias con aguja fina (Denerolle, 1996).

Desde hace mucho tiempo se sabe que la serología solo identifica el 50-60% de casos de la población canina total infectada (Mancianti et al., 1988) y que no es tan sensible como trabajos anteriores parecen indicar (Cabral et al., 1998). Para otros autores y desde un punto de vista global, los falsos negativos, en técnicas que utilizan el parásito completo como Ag, no llegan a más del 2-5%. El aspecto más conflictivo en el diagnóstico serológico radica en aquellos animales en los que mediante las técnicas mencionadas se detectan tasas bajas de Ac, que sin ser totalmente negativas no superan el umbral de positividad. La proporción de animales que se hallan en esta circunstancia en una zona geográfica determinada varía en función directa al grado de endemidad, alcanzando el 50% de la población canina en algunas zonas de Cataluña (Portus-Vinyeta, 1997). Dentro de este grupo de animales se encuentran los que se hallan en la fase prepatente de la enfermedad, los que mantienen el parásito de forma críptica, los que autolimitaron una infección previa, los que tienen una baja respuesta humoral y aquellos que reciben varias inoculaciones por el vector sin llegar a establecer una asociación estable (Portus-Vinyeta, 1997). En un estudio epidemiológico en la zona endémica con mayor incidencia de Leishmaniosis humana en España, un 34,6% de

perros eran claramente seropositivos mientras que un 40% eran dudosos (Morillas et al., 1996). Esto ilustra uno de los grandes problemas de la serología.

Citología

El diagnóstico definitivo suele basarse en la identificación citológica o histológica de amastigotes. La especificidad del método es del 100% en manos expertas, pero la sensibilidad máxima es de alrededor del 80% en perros sintomáticos y mucho menor en perros seropositivos asintomáticos. También depende del tiempo que se invierta en examinar los frotis en busca del parásito (Slappendel y Ferrer, 2000).

Es más probable encontrar los amastigotes en aspirados de médula ósea que en ganglios linfáticos (Kontos y Koutinas, 1993). Mientras que para otros, los aspirados de ganglio poplíteo son el mejor método de llegar al diagnóstico parasitológico (Guy et al., 1993). En casos raros se ha descrito la presencia de parásitos en leucocitos de sangre periférica (Slappendel, 1988). En la experiencia de algunos autores, el número de amastigotes detectado en los aspirados varía considerablemente y puede haber pocos parásitos en casos avanzados (Kontos y Koutinas, 1993). El examen directo fue más fiable para el diagnóstico que el cultivo parasitológico (Kager et al., 1984).

Las pruebas inmunohistoquímicas se utilizan también para la observación directa del parásito con la ventaja de facilitar mucho su detección. Pueden realizarse sobre muestras fijadas en formalina (Bourdoiseau et al., 1997).

PCR

La aplicación de diagnósticos basados en el ADN ofrece ventajas al diagnóstico de las enfermedades infecciosas por su gran sensibilidad, capacidad de identificar el microorganismo responsable y no depender de la respuesta inmune del hospedador. La amplificación de una secuencia específica del ADN genómico o del kinetoplasto de *Leishmania* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa mejora los resultados obtenidos mediante el examen directo, cultivo y técnicas serológicas convencionales en los animales examinados (Cairó, 1997; Portús-Vinyeta, 1997). Representa un avance muy importante en el diagnóstico de leishmaniosis canina y puede realizarse en sangre, fluidos, tejidos o incluso sobre preparaciones de histopatología (Solano-Gallego et al., 2011). Los ensayos que detectan el ADN del kinetoplasto parecen ser los más sensibles para el análisis de tejidos infectados. Además, el método de PCR en tiempo real permite cuantificar la carga parasitaria en las muestras de perros infectados, lo que es útil para el diagnóstico pero también para el seguimiento y control de la respuesta al tratamiento (Solano-Gallego et al., 2011). Al ser la PCR una técnica muy sensible,

sus resultados deben interpretarse separando el concepto de animal infectado del concepto de animal enfermo.

Reacción intradérmica

La reacción intradérmica (reacción de Montenegro) utilizando material proveniente de las formas flageladas, generalmente se vuelve positiva al principio de la enfermedad y así permanece. No es útil en el caso de lesiones muy tempranas o de enfermedad anérgica cuando no se produce respuesta inmune celular (Beneson, 1983). En el resto de casos la reacción se hace positiva en unas 6 semanas y persiste toda la vida (Garnham y Humphrey, 1985). En perros infectados experimentalmente no se apreciaron reacciones positivas en ningún caso (Martínez et al., 1995). En leishmaniosis cutánea difusa humana tampoco se obtienen reacciones positivas, que consisten en una reacción de hipersensibilidad retardada con inflamación de la dermis en el punto de inoculación (Garnham y Humphrey, 1985).

FENÓMENOS INMUNOPATOLÓGICOS DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

Complejos inmunes circulantes

El perro es un modelo ideal para el estudio de las alteraciones del sistema inmune en la leishmaniosis humana (Brandonisio et al., 1990). La producción de Ac es enorme, pero perjudica más que protege al paciente. Los Ac específicos pueden opsonizar los amastigotes facilitando su fagocitosis por los macrófagos, precisamente la célula que parasita este protozoo. Además, se producen muchos Ac que no parecen ser específicos frente al parásito y que pueden incluir auto-anticuerpos capaces de desarrollar lesiones inmunomediadas (Slappendel, 1988). Varios trabajos han confirmado la elevada incidencia de CIC en pacientes con Leishmaniosis visceral (Carvalho et al., 1983; Pearson et al., 1983; Galvao-Castro et al., 1984).

La leishmaniosis comparte algunos síntomas con el LES canino, tales como poliartritis, lesiones mucocutáneas, glomerulonefritis, fiebre, linfadenopatía y esplenomegalia (Henriksson et al., 1998). Desde hace tiempo se considera que el LES se produce como consecuencia de la formación de complejos Ag-Ac que causan la lesión de los tejidos. Se desconoce si los antígenos son del propio paciente o exógenos (Koffler, 1980). En la leishmaniosis canina, la formación de inmunocomplejos, compuestos por antígenos parasitarios y

anticuerpos del hospedador causa alteraciones orgánicas como insuficiencia renal, uveítis, vasculitis y poliartritis (Varela y Valladares, 1997).

Se ha demostrado la precipitación de inmunocomplejos sobre la membrana basal de glomérulos y túbulos en las áreas mesangiales (Palacio et al., 1997). Desde hace tiempo, se ha demostrado la capacidad de distintos tipos de CIC para inducir lesiones renales, provocar granulomas o lisar plaquetas (Sharp et al., 1971), y existen muchas pruebas de que los complejos solubles circulantes compuestos por anticuerpos nucleares participan en la patogenia de las lesiones renales (Sharp et al., 1971).

Los mecanismos implicados en la generación de los CIC durante la leishmaniosis visceral no son bien comprendidos y se han propuesto varias hipótesis. Primero, la reacción de los antígenos parasitarios circulantes con sus correspondientes anticuerpos sería la causa de la aparición de CIC como se ha demostrado en otras enfermedades parasitarias. Sin embargo, CIC purificados de un paciente con leishmaniosis visceral no contenían apenas antígenos parasitarios. En segundo lugar, los CIC pueden también formarse por una reacción entre los auto-anticuerpos y sus correspondientes antígenos. Los CIC pueden ser consecuencia de la interacción entre Ig como se ha demostrado en modelos experimentales de activación policlonal de células B. De hecho, se sabe que los Ac iniciados en la

activación policlonal de linfocitos B pueden reaccionar con otras moléculas de Ig, actuando como factores similares al factor reumatoide (Galvao-Castro et al., 1984). La correlación significativa encontrada entre el C1q, niveles de factor reumatoide y de IgG son indicativos de la participación del factor reumatoide en la generación de CIC como se ha demostrado en la tripanosomiasis humana. Otro segundo tipo de interacción entre inmunoglobulinas son los Ac anti-idiotipos. La interacción de estos Ac con varios determinantes idiotípicos se ha demostrado en ratones con tripanosomiasis (Galvao-Castro et al., 1984).

Si bien se acepta la implicación de CIC en la patogenia de las poliartritis asociadas a leishmaniosis, en la práctica es difícil probar el papel de estos CIC. Los CIC de mayor capacidad patógena son lo que se forman en presencia de un ligero exceso de Ag. Son complejos pequeños que fijan el complemento con menor eficacia que los complejos grandes. Ello hace que sean eliminados por el SMF con mayor dificultad, circulen durante más tiempo y puedan depositarse en estructuras vasculares especializadas (uvea, riñón, articulaciones) donde provocan el inicio de reacciones inflamatorias, bien a través del propio complemento fijado, que estimula la atracción de neutrófilos o bien por la acción directa sobre estos CIC de las plaquetas. Estos complejos pequeños una vez fijados pueden solubilizarse o ser reabsorbidos, dificultando su identificación, aunque ello no explicaría

por qué en otras localizaciones (glomérulo renal) sí son fáciles de identificar (Varela y Valladares, 1998).

La persistencia de CIC en pacientes con leishmaniosis visceral puede estar favorecida por otros mecanismos; *L. donovani* es un parásito intracelular obligatorio que induce una proliferación local de las células del SMF en medula ósea, nódulos linfoides, bazo e hígado. Es posible que los parásitos interfieran con la capacidad de estas células para eliminar los CIC. Los daños hepáticos son similares a los observados en la hepatitis crónica y en las fases iniciales de la cirrosis hepática (Galvao-Castro et al., 1984).

La distribución eficiente de CIC a las células del SMF y su procesamiento evita el riesgo potencial de lesiones por depósito de CIC en los tejidos y también puede ser importante en el desarrollo de la respuesta inmune humoral. En roedores y primates, el hígado y el bazo son los principales puntos de eliminación de los CIC (Davies et al., 1995).

Los CIC pueden jugar un papel importante en la disminución de la capacidad fagocítica. Trabajos previos han demostrado que los CIC son capaces de afectar a la capacidad fagocítica de los PMN humanos en personas con leishmaniosis visceral. En perros, la elevación de los niveles de CIC se ha demostrado por varios autores, y por tanto es posible pensar que la menor capacidad fagocítica en perros con

leishmaniosis esté relacionada con estos CIC. De hecho, los CIC pueden unirse a los receptores Fc de los monocitos bloqueando la opsonización de Ac (Brandonisio et al., 1990). Los CIC y el FR pueden inhibir el desarrollo de una respuesta inmune celular específica (Pearson et al., 1983). Otros autores han demostrado que los monocitos de perros infectados con leishmania muestran una deficiente capacidad para fagocitar *L. Infantum* o *C. Albicans* (Brandonisio et al., 1990).

Aunque se ha establecido una clara relación entre los CIC y las lesiones de la enfermedad renal y vascular, resulta difícil identificar el mecanismo de las alteraciones tisulares en otras manifestaciones del LES. Los estudios realizados en biopsias cutáneas por inmunofluorescencia muestran que alrededor de la mitad de los pacientes con LES poseen depósitos de CIC en la membrana basal de la epidermis, aunque no siempre producen inflamación (Koffler, 1980). La incidencia de estos depósitos en la piel normal aumentaba en pacientes con enfermedad renal, los cuales a menudo mostraban concentraciones mayores de CIC (Koffler, 1980). Las biopsias de pacientes con LES y con proteinuria importante mostraban depósitos granulares de Ig y Complemento a lo largo de la membrana basal del glomérulo, la membrana a través de la cual se filtra la sangre. El depósito continuado de dichos CIC determina el engrosamiento de las paredes capilares. Los CIC pueden identificarse gracias a que la

fracción C1q del Complemento forma un precipitado con agregados de Ig (Koffler, 1980).

En el papel patogénico de los CIC parecen ser importantes las diferencias cualitativas de los anticuerpos, tales como su avidéz o tendencia a unirse al Ag. En un experimento se ajustó la dosis de Ag de forma que se mantuviera un moderado exceso de Ag, es decir, un estado en el que había algo más de Ag que de Ac en los complejos. Estos complejos eran especialmente aptos para provocar una glomerulonefritis membranosa crónica. El comienzo de la nefritis coincidía con un marcado incremento de depósitos en el riñón, lo que sugería que la lesión inicial facilitaba el incremento de los depósitos y que un posible factor adyuvante era la saturación del SMF (Koffler, 1980). Los CIC varían en cuanto a su potencial patógeno y ello explica en parte el amplio margen de síntomas clínicos. El lugar del depósito y la iniciación de la respuesta inflamatoria dependen del tamaño del CIC, del número de sitios de unión de los antígenos con los anticuerpos, del número de anticuerpos distintos y de su afinidad por los antígenos (Koffler, 1980).

Es necesario considerar tres factores importantes para valorar el *status* renal de los perros con leishmaniosis: el depósito de anticuerpos y CIC sobre la membrana basal del glomérulo, la tubulonefrosis especialmente del túbulo proximal y la proteinuria. El aumento en la excrección urinaria de enzimas es consecuencia del depósito de CIC y

de la tubulonefrosis (Palacio et al., 1997). Los CIC se detectaron en el 100% de perros con leishmaniosis e insuficiencia renal. La proteinuria normalmente desaparece con el tratamiento pero no la insuficiencia renal (Slappendel, 1988). A la vista de otras enfermedades por inmunocomplejos, la leishmaniosis canina debe considerarse una enfermedad por inmunocomplejos con insuficiencia renal como la última consecuencia (Slappendel, 1988).

Los CIC se han incriminado como la causa de vasculitis (arteritis) sistémica necrotizante en perros con leishmaniosis (Pumarola et al., 1991). La vasculitis sistémica es característica de una variedad de síndromes clínicos y produce inflamación de vasos y alteraciones isquémicas. La mayoría de vasculitis se considera que tienen un origen inmunomediado, participando reacciones de hipersensibilidad de tipo III y IV o por la presencia de auto-Ac frente a antígenos de las paredes vasculares (Pumarola et al., 1991). En los dos casos de arteritis necrotizante sistémica descritos, los síntomas fueron edemas de la cabeza en un perro y síntomas gastrointestinales en el otro. Histopatológicamente, múltiples órganos estaban afectados y las lesiones se atribuyeron al depósito de CIC (Pumarola et al., 1991). En un perro se detectaron auto-aglutininas y ANA en asociación con artritis no-supurativa (Ciaramella et al., 1997).

Otra forma de abordar el estudio de los CIC consiste en examinar las crioglobulinas, globulinas que precipitan en zonas donde

la temperatura corporal es inferior a la normal. Pacientes con grandes cantidades de crioglobulinas, constituidas fundamentalmente por IgM, mostraban importantes depósitos de IgM en sus riñones, en contraste con otros pacientes con LES renal donde la principal Ig era la IgG. El factor reumatoide IgM es también el principal componente de las crioglobulinas circulantes en el LES (Koffler, 1980). Las crioglobulinas en altas concentraciones se han demostrado en el suero de perros con leishmania. En épocas frías, las crioglobulinas precipitan en los capilares sanguíneos de la extremidades y otras zonas distales produciendo isquemia y necrosis (Slappendel, 1988).

Anticuerpos antinucleares

Los anticuerpos antinucleares constituyen una parte importante de los CIC encontrados en enfermedades como el LES y en algunas enfermedades parasitarias crónicas tales como la malaria o la tripanosomiasis. En ambos casos se ha demostrado el desarrollo de ANA, en este caso contra ADN-cs y ADN-dc (Thivolet et al., 1965; Adu et al., 1982).

El LES ha servido de prototipo para el estudio de las enfermedades producidas por CIC (Koffler, 1980). En el LES los principales anticuerpos circulantes están dirigidos principalmente contra antígenos nucleares (Koffler, 1980). Se ha demostrado además, que existe una correlación sorprendente entre las exacerbaciones de la enfermedad y la reducción de los niveles séricos del Complemento,

que es fijado por los CIC y depositado en los tejidos o eliminado por las células del SMF (Koffler, 1980). El complejo Ac-ADN fue el primer agente específico productor de lesión tisular identificado en la glomerulonefritis del LES humana (Koffler, 1980). En la glomerulonefritis, los anticuerpos de alta afinidad se depositan en el riñón preferencialmente en forma de complejos. En consecuencia, si se determinan únicamente los anticuerpos circulantes presentes en el suero, no se detectarán aquellos anticuerpos de mayor avidéz que formen parte de los CIC precipitados (Koffler, 1980).

En personas con uveitis secundaria e idiopática se ha demostrado la presencia de ANA anti-ds-ARN y ADN-dc en el 37 y 24% respectivamente de los pacientes (Epstein et al., 1971). Se especula que estos ANA sean la consecuencia de una hiperreactividad inmune similar a lo que ocurre en el LES. Estos pacientes con uveitis alcanzaban unos títulos de ANA tan altos como los del LES. Como en otros trabajos es difícil saber si los ANA son la causa de la uveitis o sólo una consecuencia más de una alteración inmune generalizada, lo cual no le resta importancia patogénica (Epstein et al., 1971).

En leishmaniosis humana se han investigado los ANA (Argov et al., 1989). Se observó una diferencia clara entre el nivel de ANA para antígenos nucleares no-histonas en pacientes con leishmaniosis cutánea respecto a leishmaniosis visceral. En el suero de pacientes con leishmaniosis visceral, se detectaron anticuerpos anti Sm, RNP y

SS-B en el 83, 86 y 73% de los pacientes respectivamente. Por el contrario, en la leishmaniosis cutánea menos del 25% mostraron ANA. También encontraron que personas sanas de áreas endémicas tenían más ANA que las personas sanas de áreas no endémicas. Esto parece indicar una exposición constante a los agentes patógenos que también estimula el sistema inmune a producir un repertorio más amplio de antígenos nucleares. Los mismos autores investigaron otros antígenos nucleares, concretamente ADN-cs, histonas y SS-A sin que hubiera diferencias significativas entre la leishmaniosis visceral y cutánea.

La prevalencia de ANA en la leishmaniosis canina ha sido determinada previamente. En 14 de 45 perros con leishmaniosis (31%), se encontró un título positivo de ANA (Slappendel, 1988). En otro estudio 28 de 53 perros (52%) mostraron títulos positivos de ANA. Cinco de 24 dieron pruebas de Coombs directo positivos (Ciaramella et al., 1997). En un estudio anterior, empleando criocortes de hígado de rata como substrato, la prevalencia de ANA en perros con leishmania fue del 15,9% y su presencia no estuvo asociada significativamente a la aparición de glomerulonefritis (Lucena et al., 1996). La muestra estudiada fue relativamente pequeña para una enfermedad tan variable clínicamente como la leishmaniosis canina.

El mecanismo preciso que conduce al desarrollo de ANA en la malaria y otras infecciones y el papel que juega en el daño tisular no se conoce (Adu et al., 1982). Se ha sugerido que el desarrollo de altos

niveles de Ac IgM contra antígenos no parasitarios en la malaria se debe a la activación policlonal de linfocitos B iniciada por mitógenos procedentes del parásito (Adu et al., 1982).

Los linfocitos B humanos normales tienen receptores para ADN y el desarrollo de Ac anti-ADN puede ser por tanto una respuesta normal a la presencia de ADN circulante. Además, los Ac humanos anti-ADN reaccionan de forma cruzada con ADN bacteriano, víricos y de otros mamíferos (Adu et al., 1982).

Varias hipótesis pueden plantearse para explicar el desarrollo de ANA en la leishmaniosis humana. La primera se basa en la hipergammaglobulinemia típica de leishmaniosis visceral. Durante la activación policlonal de células B todos los clones son estimulados incluyendo los clones auto-reactivos. Se ha demostrado que antígenos solubles del parásito son mitogénicos y disparan la producción de auto-anticuerpos. Además, incluso en la leishmaniosis cutánea, que no se caracteriza por la hipergammaglobulinemia, los Ag de leishmania pueden inducir blastogénesis y respuestas linfoproliferativas (Argov et al., 1989). El trabajo de Galvao-Castro et al. (1984) concede gran importancia a la activación policlonal como fuente de CIC, auto-Ac frente a músculo liso y ANA. Apoyan su hipótesis en la elevación de IgG e IgM. Se ha demostrado que en leishmaniosis humana se produce una alteración de la respuesta de linfocitos T y por tanto la hiperactividad de células B puede deberse a un déficit en la regulación

que las células T deben ejercer sobre ellas. En contra de esto puede objetarse que la inmunosupresión observada en la leishmaniosis humana se ha asociado a un predominio de las células T supresoras (Galvao-Castro et al., 1984).

En otras infecciones como la esquistosomiasis donde se considera que la activación policlonal es la causa de la formación de ANA, predominan los ANA anti-ADN-cs, mientras que en la leishmaniosis visceral, sólo el 4% de los pacientes tienen este tipo de ANA. Debe haber por tanto otros mecanismos implicados en la producción de auto-anticuerpos (Argov et al., 1989). Esto contrasta con otro trabajo anterior donde el 41,2% de pacientes tenían Ac anti-ADN-cs (Galvao-Castro et al., 1984). Los anticuerpos anti ADN identificados en enfermedades infecciosas son, en la mayoría de casos, anti ADN-cs con la excepción de algunas infecciones bacterianas donde los CIC estaban constituidos por complejos ADN-dc y sus autoanticuerpos específicos (Adu et al., 1982).

El segundo mecanismo para explicar la inducción de auto-anticuerpos, puede ser la liberación de antígenos secuestrados cuando las células o los tejidos adyacentes son lesionados en el curso de la enfermedad. Algunas características predominantes de la leishmaniosis visceral que pueden ser la consecuencia de respuestas inmunes frente a antígenos secuestrados son la anemia, leucopenia, ulceración intestinal y daño miocárdico (Argov et al., 1989).

Una tercera hipótesis para la inducción de auto-anticuerpos es la imitación o el mimetismo molecular. Hay reacciones cruzadas entre los antígenos del agente infectante y los del hospedador. Esto se ha demostrado en infecciones por micobacterias y en el caso de leishmania existe la posibilidad de que se compartan determinantes antigénicos entre los antígenos Sm, RNP y SS-B, ya que se ha demostrado la inhibición de ANA para estos antígenos mediante la incubación de las muestras con cultivos de promastigotes, algo que sucedía con 4 especies diferentes de leishmania. Por este motivo y por el trabajo realizado con monoclonales frente a antígenos de leishmania, es posible que este mecanismo sea el principal implicado en la formación de ANA en la leishmaniosis visceral humana (Argov et al., 1989).

La significación clínica de los anticuerpos anti-ADN-cs en malaria no se conoce. Al igual que en el LES se pueden producir lesiones tisulares por depósitos de CIC ADN-anti-ADN (Tan et al., 1966), es posible que los CIC presentes en malaria jueguen un papel similar (Adu et al., 1982).

En personas con esquistosomiasis crónica, se producen alteraciones profundas en el sistema inmune que son probablemente la consecuencia de la presencia de una gran cantidad de antígenos parasitarios durante mucho tiempo o toda la vida del enfermo. Se

considera que estos ANA tienen consecuencias en la patogenia y lesiones de la enfermedad (Bendixen et al., 1984). Se ha comprobado que los anticuerpos contra ENA, particularmente contra el Ag Sm son una característica frecuente en la esquistosomiasis crónica humana. Otros pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas similares de tipo conectivo presentan un perfil de ANA significativamente distinto (Bendixen et al., 1984).

Se ha observado que las proteínas ribosómicas acídicas del parásito *L. infantum* son antígenos importantes que inician una respuesta inmune muy acusada tanto en el hombre como en el perro. La proteína es un inmunógeno potente. Parece ser, sin embargo, que a pesar de que las proteínas ribosómicas están muy conservadas a lo largo de la filogenia, los Ac producidos serían específicos de *Leishmania* y no reaccionan con las proteínas ribosómicas de otras especies (Soto et al., 1996; Soto et al., 1998; Soto et al., 2000). En caso contrario, se producirían reacciones cruzadas y los Ac anti-ribosomas constituirían ANA.

Otras proteínas nucleares inmunogénicas son las histonas del parásito. Los perros con infección natural tienen anticuerpos que reaccionan con las histonas H2B y H4. Esta inmunorespuesta sería también específica para histonas del parásito y no habría reacción cruzada con histonas de mamíferos. Se hizo un estudio comparativo de la prevalencia de anticuerpos entre perros con *leishmania*

enfrentando el suero con 4 tipos de histonas. Aunque la respuesta inmune fue muy heterogénea frente a estas proteínas, las histonas H2B y H3 fueron inmunógenos más prevalentes que las histonas H2A y H4 en la leishmaniosis natural (Soto et al., 1998; Soto et al., 1999).

Autoinmunidad

Varias enfermedades producidas por parásitos, bacterias y virus se han asociado con la inducción de auto-anticuerpos. El mecanismo puede ser la estimulación de un clon de linfocitos que segreguen un auto-Ac específico o de una población completa de clones auto-reactivos como ocurre en las activaciones policlonales de células B (Argov et al., 1989). Esta última situación se acompaña de hipergammaglobulinemia. La leishmaniosis humana es uno de estas enfermedades y ha sido estudiada como modelo para explicar la relación entre la infección y la autoinmunidad (Argov et al., 1989).

En la leishmaniosis humana, la hipergammaglobulinemia se asocia con la aparición de una serie de auto-anticuerpos incluyendo anticuerpos anti antígenos nucleares, CIC y factor reumatoide (Bergeaud, 1988; Argov et al., 1989).

En personas sanas se ha descrito la presencia de Ac naturales séricos frente a diferentes auto-antígenos como tubulina, actina, mioglobina, albúmina y transferrina (Avrameas et al., 1981). En leishmaniosis visceral humana se han detectado anticuerpos

circulantes frente a tubulina y filamentos intermedios (Argov et al., 1989).

Los antígenos de la membrana del parásito son especialmente importantes pues se ven expuestos y estimulan directamente al sistema inmune del animal (Pateraki et al., 1983). Desde hace tiempo se conoce la presencia de tubulina y tal vez actina en la superficie del parásito y se ha demostrado que los anticuerpos específicos para estas proteínas también reconocen y reaccionan contra la tubulina y actina presentes en las células del perro (Pateraki et al., 1983). Al igual que con los ANA y otros auto-anticuerpos, lo que no se ha demostrado claramente es el papel patógeno que puedan tener. Existen dos hipótesis para explicar la presencia de anticuerpos antiactina y antitubulina en la leishmaniosis canina. La primera es que tanto los auto-anticuerpos como la hipergammaglobulinemia son producto de la activación policlonal de los linfocitos B. La segunda es que los anticuerpos anti-actina y antitubulina se producen de forma específica frente a los antígenos del parásito. Esta hipótesis se ve apoyada por la presencia de tubulina en la membrana del parásito. Ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes (Pateraki et al., 1983).

Aunque existen evidencias de la presencia de procesos autoinmunes en la leishmaniosis visceral humana, no se conoce si los auto- anticuerpos están directamente implicados en la patología de la enfermedad (Galvao-Castro et al., 1984). En las formas

mucocutáneas, sin embargo, existen evidencias circunstanciales que apuntan a un proceso de autoinmunidad responsable de la destrucción tisular iniciado posiblemente por reacción cruzada entre antígenos del parásito y del hospedador, igual que se ha especulado en las infecciones por *L. donovani* y *T. cruzi* en el hombre. Así, la predilección por el daño tisular visto a nivel mucocutáneo, podría explicarse por una localización preferencial de anticuerpos con reacción cruzada en esta parte del cuerpo (Presto, 1987; Towbin et al., 1987).

En el perro, las células B de animales infectados muestran una producción exagerada de anticuerpos cuando se estimulan con un extracto de antígenos de leishmania. Esta activación policlonal de células B se asocia con la producción de auto-anticuerpos y de hecho, todos los perros con leishmania parecen presentar auto-anticuerpos frente a músculo liso y estriado, mitocondrias y antígenos nucleares (Brandonisio et al., 1990). Aparte de la activación policlonal, las reacciones cruzadas entre antígenos del hospedador y del parásito es otro origen de auto-anticuerpos demostrado en la leishmaniosis canina, donde también se han identificado anticuerpos anti-actina y anti-tubulina (Pateraki et al., 1983). Estos auto-anticuerpos pueden estar relacionados con las lesiones de miocarditis y dermatomiositis descritas en perros con leishmaniosis (Brandonisio et al., 1990).

La atrofia muscular es un síntoma frecuente en perros con leishmaniosis. En biopsias musculares de estos animales se ha

demostrado la presencia de amastigotes dentro de macrófagos y células musculares junto con CIC IgG. Además, existen auto-anticuerpos frente a las células musculares en el suero de todos los perros estudiados (Vamvakidis et al., 2000).

En ratones infectados de forma experimental, se ha identificado la producción de auto-anticuerpos con reacción cruzada frente a proteínas musculares (Preston, 1987). Ceci et al. (1988) encontraron títulos positivos de anticuerpos anti músculo cardíaco en 19 de 35 perros con leishmaniosis.

También se ha demostrado la existencia de reacciones cruzadas entre glicoproteínas liberadas por el parásito y proteínas de la membrana de eritrocitos humanos (Decker-Jackson y Honigberg, 1978; Kager et al., 1984; Towbin et al., 1987). Estos auto-Ac se ponen de manifiesto en la prueba de Coomb's y son de la clase IgG. Mediante pruebas de aglutinación también se encontraron anticuerpos anti linfocitos, granulocitos y plaquetas en el suero de algunas personas con leishmaniosis visceral. En el caso de los anticuerpos anti-eritrocitos y anti-plaquetas, el porcentaje de sueros positivos fue de más del 80% (Kager et al., 1984).

La anemia asociada a leishmaniosis también se considera de origen inmunomediado (Bergeaud, 1988). En perros con leishmaniosis se demostró que la fluidez de la membrana de los eritrocitos está

disminuida (DeLuna et al., 2000). Aunque estos autores no investigan la posibilidad de auto-anticuerpos frente a proteínas de superficie del eritrocito, este mecanismo podría explicar esta mayor rigidez, que provocaría secuestro esplénico y menor vida media de las células.

En la leishmaniosis visceral y cutánea humana se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgM frente a galactocerebrósidos. La distribución de galactocerebrósidos en mamíferos está restringida. No se encuentran en ningún órgano con excepción del riñón además del cerebro, donde, especialmente la sustancia blanca, es rico en galactocerebrósidos a nivel de la mielina. La interacción de Ac con los galactocerebrósidos se ha implicado en alteraciones de la mielina. Por este motivo, la presencia de anticuerpos anti galactocerebrósidos en leishmaniosis y en la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis) se piensa puede participar en los síntomas nerviosos de ambas enfermedades (Avila y Rojas, 1990). El origen de estos auto- anticuerpos sería una reacción cruzada con antígenos del quinetoplasto que son comunes a ambos parásitos (Avila y Rojas, 1990).

MATERIAL Y MÉTODOS

En general, al ser nuestro objetivo estudiar la prevalencia de ANA en leishmaniosis canina, el criterio de inclusión empleado fue la existencia de un diagnóstico fiable mediante citología, en aspirados de ganglio poplíteo o en médula ósea. Una parte de los animales incluidos lo fueron de forma retrospectiva, mientras que otra parte de la población estudiada se incluyó de forma prospectiva. En todos los animales se disponía de información del examen clínico, donde se buscaron con especial atención los síntomas más frecuentemente asociados con el depósito de inmunocomplejos circulantes, como son la presencia de glomerulonefritis, dermatitis, uveitis y artritis. Además del examen clínico, en la mayoría de ellos se disponía de los resultados del hemograma y en todas las muestras se realizó bioquímica sanguínea con determinación, como mínimo, de proteínas totales, urea y creatinina séricas. En los perros incluidos con carácter prospectivo, se realizó la determinación del cociente proteína/creatinina en orina (UPC).

PREVALENCIA DE ANA EN LA LEISHMANIOSIS CANINA

Inmunofluorescencia sobre hígado de rata

Población

Se emplearon 60 perros con leishmaniosis adquirida de forma natural (Tabla 6). Todos los perros eran sintomáticos y el diagnóstico se confirmó mediante observación directa del parásito en aspirados de ganglio linfático.

Perro Nº	Raza	Sexo	Edad	Perro	Raza	Sexo	Edad
1	Pastor Alemán	M	4,5	70	Bretón	H	3
2	Pastor Belga	H	5	71	Dobermann	M	2
3	Pastor Alemán	M	4	72	Dobermann	M	4
4	Pastor Alemán	M	5	73	Pastor Alemán	M	6
5	Rottweiler	M	3,5	74	Pastor Alemán	H	6,5
6	Labrador	H	4,5	75	Teckel	M	3
7	Cruzado	H	4	76	Pastor Alemán	M	3
8	Caniche	M	4	77	Drahthaar	M	6
9	Mastín	H	5	78	Pastor Alemán	M	4,5
10	Podenco	M	2,5	79	Pastor Alemán	H	4
11	Pastor Alemán	M	3	80	Schnauzer	H	3
18	Mastín	M	5,5	81	Pastor Alemán	M	3
19	Dobermann	M	4,5	82	Dobermann	M	4
20	Cocker	M	0,75	83	Pointer	H	5
24	Cruzado	M	3	84	Boxer	M	3
25	Podenco	M	5,5	85	Boxer	H	8
26	Pastor Alemán	M	5	86	Mastín	M	5
27	Pastor Alemán	M	5	87	Dobermann	H	8
30	Pastor Alemán	M	4	88	Dobermann	M	8
31	Braco Alemán	M	4	89	Mastín	M	3
32	Aguas español	M	5	90	Cruzado	M	6
33	Boxer	H	2	91	Pastor Alemán	M	7
34	Dobermann	H	3	92	Dobermann	M	5
59	Aguas español	M	5	93	Mastín	H	4,5
60	Cruzado	M	5	94	Labrador	M	4
61	Dobermann	H	7	95	Dobermann	M	6
62	Braco Alemán	M	3,5	96	Pastor Alemán	M	4
63	Pastor Alemán	M	7	97	Setter Ingles	M	3
64	Pastor Alemán	M	5	98	Cruzado	H	8
69	Cruzado	H	4	99	Podenco	M	3

Tabla 6.- Reseña de los perros con leishmaniosis en la prueba de IFI con criocortes de hígado de rata. La numeración de los animales no es correlativa. N=60; M = 43; H = 17.

Material

Reactivos

- . Rata de raza Wistar de 350 g de peso, comercializada por Griffa, Barcelona.
- . 2 Metil butano, Merck.
- . Nitrógeno líquido, Merck.
- . Medio de cubrición para tejidos congelados, Tissue-tek, Miles INC.
- . Solución tampón de PBS.
- . Suero control positivo.
- . Antisuero anti IgG canina conjugado con isotiocianato de fluoresceína, desarrollada en conejo, Sigma Immuno Chemicals.
- . Medio de montaje acuoso "Immu-mount" (Shandon).

Material de laboratorio

- . Micropipeta digital Transferpettor de 10µl, Brand.
- . Micropipeta digital Pipetman de 100µl, Gilson.
- . Cubreobjetos de 24x60 mm.
- . Microscopio de epifluorescencia Axioscop, Zeiss.
- . Criotomo "2800 Frigocut N", Reichert-Jung.
- . Portaobjetos de teflón de 10 pocillos de 7 mm de diámetro, Nutacón.

Método

Se prepara un vaso de precipitado con 2-metil-butano y se introduce en un recipiente con nitrógeno líquido a -96°C para enfriarlo. A continuación, se introducen los cortes de hígado de rata, de aproximadamente $0,5 \times 0,7 \times 0,5$ mm de tamaño, en el vaso con 2-metil-butano durante 4 segundos. La introducción en metil butano y no directamente en nitrógeno líquido se realiza para que las muestras no se congelen rápidamente y no se provoque la destrucción tisular. Tras diversas pruebas hemos comprobado que el mejor tiempo de congelación es de 4 segundos, tiempo que permite una congelación total de las muestras, tanto superficial como internamente, sin que se produzca una alteración de los hepatocitos. Una vez congelados se mantienen a -70°C hasta que se proceda a realizar los cortes en el criotomo a -20°C , con un espesor de $7 \mu\text{m}$. La fijación de los cortes de hígado a los portaobjetos de teflón se realiza por diferencia de temperatura, sin necesidad de utilizar ningún fijador. Esto lo podemos realizar en virtud de que la técnica que vamos a utilizar requiere poco tiempo de realización, con lo que no da tiempo a que las muestras se despeguen del portaobjetos. Las muestras así preparadas se conservan a -70°C hasta su utilización.

Una vez preparados los portaobjetos con los cortes de hígado, comenzamos la siembra de los mismos. Para la realización de la inmunofluorescencia indirecta necesitamos incluir en cada porta un

control positivo y otro negativo, para comprobar la fiabilidad de la técnica. El control positivo es un suero de perro ANA positivo, por lo que dará fluorescencia positiva. Utilizamos como control negativo la solución tampón de PBS que no fija la fluorescencia.

La técnica consiste en sembrar en cada pocillo 25 µl de cada muestra problema a una dilución de 1:20 en PBS teniendo cuidado de que no rebose, ya que se mezclarían los distintos plasmas e induciría a error en la interpretación. Esta dilución se empleó como título de corte, ya que utilizada sobre una muestra de 30 animales sanos no se obtuvieron resultados positivos. En cuanto al control positivo, se siembran 25 µl del mismo a una dilución de 1:10 en PBS, dilución a la que este suero produce un resultado positivo. En lo referente al control negativo, sembramos 25 µl de PBS. En cada porta caben 10 muestras, 8 problemas y los 2 controles. Tras la siembra, se dejan incubar los portaobjetos a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se lavan los portaobjetos por inmersión en PBS, primero durante 5 minutos y a continuación durante 10 minutos. Tras esta fase de lavado secamos los portaobjetos con papel absorbente con cuidado de no tocar los cortes de hígado.

El siguiente paso consiste en añadir a cada pocillo 25 µl de antisuero anti-IgG marcados con isotiocianato de fluoresceína a una dilución de 1:50 en PBS. Esta dilución es la más adecuada después de ensayar diversas diluciones. Este paso debe hacerse rápido para

evitar que se sequen los portaobjetos y se pierda fluorescencia. Tras este paso, se incuban los portaobjetos a temperatura ambiente en medio húmedo y en cámara oscura durante 30 minutos.

A continuación, se lavan de nuevo los portaobjetos siguiendo la misma técnica que al principio. Se secan y se les coloca un cubreobjetos encima fijado con el medio de montaje acuoso "Immu-mount", especialmente preparado para que se fije el cubreobjetos y no de interferencias en la observación con el microscopio de fluorescencia. Tras esto, se observan los portaobjetos en el microscopio de fluorescencia, con una lámpara de vapor de mercurio, a 20 y 40 aumentos y en fondo oscuro.

Inmunofluorescencia sobre células Hep 2

Población

Se emplearon 67 perros con leishmaniosis adquirida de forma natural (Tabla 7). Todos los perros eran sintomáticos y el diagnóstico se confirmó mediante observación directa del parásito en aspirados de ganglio linfático.

Perro	Raza	Sexo	Edad		Perro	Raza	Sexo	Edad
1	Pastor Alemán	M	4,5		35	Boxer	M	4
2	Pastor Belga	H	5		36	Pastor Alemán	M	3
3	Pastor Alemán	M	4		37	Galgo	H	2
4	Pastor Alemán	M	5		38	Dobermann	M	5
5	Rottweiler	M	3,5		39	Pit bull Terrier	M	1
6	Labrador	H	4,5		40	Pointer	H	4
7	Cruzado	H	4		41	Pastor Alemán	M	2
8	Caniche	M	4		42	Fox-terrier	M	1
9	Mastín	H	5		43	Cocker	M	3
10	Podenco	M	2,5		44	Pointer	H	2
11	Pastor Alemán	M	3		45	Bretón	H	6
12	Gran Danés	M	2		46	Aguas español	M	1
13	Pastor Alemán	M	3,5		47	Schnauzer	H	7
14	Pastor Alemán	M	3		48	Cruzado	M	8
15	Cruzado	H	2		49	Mastín	M	3
16	Rottweiler	M	5		50	Husky	H	2
17	Pastor Alemán	H	5		51	Pointer	H	6
18	Mastín	M	5,5		52	Podenco	H	5
19	Dobermann	M	4,5		53	Gran Danés	H	2
20	Cocker	M	0,75		54	Boxer	M	3
21	Bretón	H	5		55	Cruzado	H	2
22	Pastor Alemán	M	5		56	Rottweiler	H	0,75
23	Aguas español	H	1,25		57	Cruzado	M	4
24	Cruzado	M	3		58	Pastor Alemán	M	1,25
25	Podenco	M	5,5		59	Aguas español	M	5
26	Pastor Alemán	M	5		60	Cruzado	M	5
27	Pastor Alemán	M	5		61	Dobermann	H	7
28	Gran Danés	H	4,5		62	Braco Alemán	M	3,5
29	Bretón	H	4,5		63	Pastor Alemán	M	7
30	Pastor Alemán	M	4		64	Pastor Alemán	M	5
31	Braco Alemán	M	4		65	Presa canario	M	6
32	Aguas español	M	5		66	Bretón	M	2,5
33	Boxer	H	2		67	Dobermann	H	4,5
34	Dobermann	H	3					

Tabla 7.- Reseña de los perros con leishmaniosis en la prueba de IFI con células HEp-2. N = 67; M = 42; H = 25.

Material

Reactivos

Todos los reactivos empleados corresponden a los suministrados en el “canine ANA HEp-2 screening kit” (INOVA diagnostics Inc).

- . Portaobjetos para inmunofluorescencia de 12 pocillos cubiertos con células HEp-2
- . Conjugado anti IgG canina (H + L).
- . Control positivo.
- . Control negativo.
- . Medio de montaje.
- . Buffer fosfato salino pH 7,4 (PBS).

Material del laboratorio

- . Micropipetas digitales de diversos volúmenes, Nychiryo.
- . Pipetas de Pasteur desechables.
- . Cámara húmeda.
- . Microscopio de fluorescencia Olympus BX40.

Método

Se prepara el PBS diluyendo la solución concentrada con 1 litro de agua destilada. El PBS se emplea para diluir las muestras problema con una dilución inicial de 1:40 a partir de la cual se considera la

positividad. La titulación de las muestras positivas se efectúa mediante diluciones dobles en PBS. Este punto de corte es el recomendado por el fabricante y fue comprobado sobre una muestra de 30 animales sanos donde no se obtuvieron resultados positivos.

Los portaobjetos con el substrato de células epiteliales se dejan a temperatura ambiente durante unos minutos. Se añade una gota en cada pocillo de los controles positivo y negativo en cada uno de los portaobjetos. A continuación se colocan 50 µl de cada muestra problema. Los portaobjetos, con 10 pocillos cada uno, se incuban en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Después de la incubación se lavan los pocillos con buffer PBS mediante inmersión durante 5 minutos. Después se sacuden los portaobjetos enérgicamente para eliminar el exceso de PBS. En el siguiente paso se añade el conjugado, un suero anti IgG canina (H+L) marcado con un fluorocromo. Los portabjetos no deben secarse entre un paso y otro. El conjugado se incuba en cámara húmeda y oscura durante otros 20 minutos, tras los cuales se repite el proceso de lavado. Finalmente se coloca un cubreobjetos sobre el que se han aplicado unas gotas de medio de montaje de tal modo que cubra los pocillos con el substrato sin que se formen burbujas de aire.

La presencia de fluorescencia se establece observando las muestras en un microscopio de fluorescencia con una lámpara de

mercurio de 495 nm y empleando un filtro de 515 nm de longitud de onda.

ISOTIPOS DE LOS ANA EN LA LEISHMANIOSIS CANINA

Población

Se seleccionaron los 14 perros ANA positivos por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata (Tabla 8).

PERRO	RAZA	SEXO	EDAD
1	Pastor Alemán	M	4,5
2	Pastor Belga	H	5
3	Pastor Alemán	M	4
4	Pastor Alemán	M	5
5	Rottweiler	M	3,5
6	Labrador	H	4,5
7	Cruzado	H	4
8	Caniche	M	4
9	Mastín	H	5
10	Podenco	M	2,5
11	Pastor Alemán	M	3
34	Dobermann	H	3
63	Pastor Alemán	M	7
64	Pastor Alemán	M	5

Tabla 8.- Reseña de los perros con leishmaniosis en la prueba de IFI para la determinación de los isotipos de ANA. N = 14; M = 8, H = 6.

Material

Se empleó el mismo material descrito en la técnica de IFI sobre hígado de rata.

Reactivos

Se emplearon los mismos reactivos de la técnica de IFI sobre hígado de rata con la adición de:

- . Antisueros obtenidos en conejo específicos para las cadenas pesadas de IgG, IgM e IgA caninas (ICN Biomedicals).
- . Antisero obtenido en cabra específico para IgG de conejo y marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Immunochemicals).

Método

Para la determinación de los isotipos, una vez incubados los cortes de hígado de rata con las muestras de suero a la dilución 1:20 y lavados, se añadieron 25 µl de los correspondientes antisueros diluidos 1:50 en PBS a cada una de las muestras. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente los portaobjetos se lavaron de nuevo. Los anticuerpos unidos se identificaron añadiendo 25 µl de antisuero de cabra marcado con isotiocianato y diluido 1:50 en PBS. El resto del procedimiento se desarrolló tal y como se describe en el apartado anterior. Los títulos superiores a 1:20 se consideraron positivos (Barta y Barta, 1993).

ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA DE LOS ANA EN LA LEISHMANIOSIS CANINA

Determinación de ANA anti ADN de doble cadena:
Inmunofluorescencia sobre *Crithidia*

Población

Se emplearon 34 perros con leishmaniosis adquirida de forma natural (Tabla 9). Todos los perros eran sintomáticos y el diagnóstico se confirmó mediante observación directa del parásito en aspirados de ganglio linfático.

Perro	Raza	Sexo	Edad	Perro	Raza	Sexo	Edad
1	Pastor Alemán	M	4,5	18	Mastín	M	5,5
2	Pastor Belga	H	5	19	Dobermann	M	4,5
3	Pastor Alemán	M	4	20	Cocker	M	0,75
4	Pastor Alemán	M	5	21	Bretón	H	5
5	Rottweiler	M	3,5	22	Pastor Alemán	M	5
6	Labrador	H	4,5	23	Aguas español	H	1,25
7	Cruzado	H	4	24	Cruzado	M	3
8	Caniche	M	4	25	Podenco	M	5,5
9	Mastín	H	5	26	Pastor Alemán	M	5
10	Podenco	M	2,5	27	Pastor Alemán	M	5
11	Pastor Alemán	M	3	28	Gran Danés	H	4,5
12	Gran Danés	M	2	29	Bretón	H	4,5
13	Pastor Alemán	M	3,5	30	Pastor Alemán	M	4
14	Pastor Alemán	M	3	31	Braco Alemán	M	4
15	Cruzado	H	2	32	Aguas español	M	5
16	Rottweiler	M	5	33	Bóxer	H	2
17	Pastor Alemán	H	5	34	Dobermann	H	3

Tabla 9.- Reseña de los perros con leishmaniosis en la prueba de IFI con células de *Crithidia luciliae*. N = 34; M = 22; H = 12.

Reactivos

Todos los reactivos empleados, salvo el antisuero anti IgG canina corresponden a los suministrados en el kit "Crithidia luciliae ds-DNA" (The Binding Site, Birmingham).

- . Portaobjetos recubiertos con substrato de *C. luciliae*. Cada porta incluye 5 pocillos.
- . Control positivo.
- . Control negativo.
- . Azul de Evans 1%.
- . Buffer PBS.
- . Medio de montaje de polivinil-alcohol.
- . Conjugado anti IgG canina (H+L) FITC (Sigma immunochemicals).

Material del laboratorio

- . Micropipetas digitales de diversos volúmenes marca Nichiryo.
- . Pipetas Pasteur desechables.
- . Cámara húmeda.
- . Microscopio de fluorescencia Olympus BX40.

Método

Se prepara el PBS diluyendo la solución concentrada con 1 litro de agua destilada. El PBS se emplea para diluir las muestras problema con una dilución inicial de 1:10 a partir de la cual se considera la

positividad. La titulación de las muestras positivas se efectúa mediante diluciones dobles en PBS.

Los portaobjetos con el sustrato de *Crithidia luciliae* se dejan a temperatura ambiente durante unos 30 minutos antes de sacarlos de su embalaje. Se colocan en cámara húmeda y se añade una gota en cada pocillo de los controles positivo y negativo en cada uno de los portaobjetos. A continuación se colocan 25 μ l de cada muestra problema diluida 1:10 en PBS. Los portaobjetos se incuban en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Después de la incubación se lavan los pocillos con buffer PBS mediante inmersión durante 10 minutos sin agitación. Después se sacuden los portaobjetos enérgicamente para eliminar el exceso de PBS. En el siguiente paso se añade el conjugado, un suero anti IgG canina (H+L) marcado con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína) diluido 1:32 en PBS. Es muy importante que este paso se haga rápidamente para evitar que los portaobjetos se dessequen entre un paso y otro. No deben permanecer al aire durante más de 15 segundos. El conjugado se incuba en cámara húmeda y oscura durante otros 30 minutos, tras los cuales se repite el proceso de lavado. En este paso de lavado, se pueden añadir 2-3 gotas de azul de Evans al 1% a cada 100 ml para obtener una contra tinción. Finalmente se cubren los portaobjetos con un cubreobjetos sobre el

que se han aplicado unas gotas de medio de montaje, evitando que se formen burbujas de aire.

La presencia de fluorescencia en el quinetoplasto es lo que determina la positividad y se establece observando las muestras en un microscopio de fluorescencia con una lámpara de 495 nm y con un filtro de 515 nm.

Determinación de ANA frente a ENA: técnica de doble inmunodifusión o de Ouchterlony

Población

Se emplearon las muestras de los animales donde se había investigado la presencia de ANA frente a ADN de doble cadena (Tabla 9).

Material

- . Micropipeta digital, Gilson.
- . Placas de agarosa para doble difusión radial (un pocillo central y 6 periféricos); Lab. Biognost (Gräfelfing).
- . Extractos ENA purificados para los autoantígenos: Sm y nRNP, Biognost (Gräfelfing).
- . Controles positivos monoespecíficos para los autoanticuerpos; Biognost (Gräfelfing).

. Buffer fosfato salino pH 7,2.

Método

1. Preparación de los reactivos

Los antígenos, controles y muestras se conservan a -20°C . Todos los reactivos se usan una vez que se encuentran a temperatura ambiente. Las placas de agarosa se dejan equilibrar durante 1 hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente para que reabsorban el agua de condensación que puedan haber desarrollado durante la refrigeración.

2. Preparación de las muestras

Los sueros se emplean sin diluir. En los casos donde se observan líneas de precipitación marcadas se vuelven a ensayar diluidos 1:4 en PBS para evitar el efecto de prozona. Este fenómeno se produce cuando la cantidad de Ac es muy superior a la cantidad de Ag impidiendo la formación de complejos Ag-Ac del tamaño suficiente para precipitar y que puede enmascarar líneas de identidad de anticuerpos presentes en el suero.

3. Aplicación de las muestras

Se pipetea 15 μl de cada muestra y de los controles en los pocillos periféricos y 25 μl del extracto ENA en el pocillo central. Es importante no derramar ningún reactivo sobre la superficie de la agarosa.

4. Incubación

Las placas se cierran y se incuban a temperatura ambiente (<25°C) y en cámara húmeda durante 24 horas. Evitar la iluminación directa o la proximidad con radiadores o cualquier fuente de calor.

5. Lectura de las placas

Se realiza una primera lectura a las 24 horas anotando todas las líneas de precipitación visibles. Las líneas se clasifican como: identidad, no-identidad e identidad parcial. Las placas se vuelven a examinar a las 48 horas. El examen de las placas se realiza con iluminación brillante indirecta y sobre un fondo oscuro.

Después de la incubación los pocillos deben estar llenos con líquido. Si los pocillos están vacíos es que se produjo evaporación, normalmente debido a una temperatura demasiado alta. Los cambios en la humedad de la agarosa pueden interferir con la reacción de precipitación y crear falsos negativos. Esto es especialmente importante en el sistema Sm.

Las líneas de precipitación múltiples se deben a la presencia de varios auto-anticuerpos y hacen que sea difícil su identificación. En estos casos se procede a diluir la muestra a 1:2 - 1:4 de modo que algunas líneas se hagan más débiles o que las líneas se separen facilitando su interpretación. El antígeno Sm es una mezcla de 4

ribonucleoproteínas (U1/smRNP, U2/smRNP, U4/5smRNP, U6/smRNP).

Cada una de estas partículas se compone de una o más moléculas de ARN y de 7-10 proteínas diferentes. Los epítopes típicos del sistema Sm están presentes en todas ellas y un resultado positivo se ve normalmente no como una única línea sino como varias líneas muy próximas. Los epítopes típicos del sistema RNP están presentes sólo en la unidad U1/smRNP, que contiene por tanto epítopes específicos de ambos sistemas, de modo que sueros con actividad anti-Sm o anti-RNP situados en pocillos cercanos producirán líneas de identidad parcial con un espolón típico (Tan et al., 1988).

La aparición de líneas de no identidad entre las muestras y los controles positivos se debe a la presencia de antígenos adicionales en el extracto ENA y de sus correspondientes anticuerpos en la muestra. Aunque los extractos comerciales están purificados y los antígenos que contienen se han identificado, no todos los antígenos nucleares están bien caracterizados o se dispone de sueros positivos monoespecíficos que permitan su estandarización (Tan, 1988).

Determinación de ANA frente a histonas: ELISA

Población

Para la determinación de anticuerpos anti-histonas se emplearon 93 perros con leishmaniosis adquirida de forma natural. En aproximadamente la mitad de ellos también se había determinado la presencia de ANA mediante inmunofluorescencia indirecta con el fin de

poder correlacionar ambas técnicas. Los perros eran de diferentes razas y edades (Tabla 10); el diagnóstico se confirmó mediante observación directa del parásito en médula ósea o ganglios linfáticos.

Perro	Raza	Sexo	Edad	Perro	Raza	Sexo	Edad
1	Pastor Alemán	M	4,5	32	Aguas español	M	5
2	Pastor Belga	H	5	33	Boxer	H	2
3	Pastor Alemán	M	4	34	Dobermann	H	3
4	Pastor Alemán	M	5	35	Boxer	M	4
5	Rottweiler	M	3,5	36	Pastor Alemán	M	3
6	Labrador	H	4,5	37	Galgo	H	2
7	Cruzado	H	4	38	Dobermann	M	5
8	Caniche	M	4	39	Pit bull Terrier	M	1
9	Mastín	H	5	40	Pointer	H	4
10	Podenco	M	2,5	41	Pastor Alemán	M	2
11	Pastor Alemán	M	3	42	Fox-terrier	M	1
12	Gran Danés	M	2	43	Cocker	M	3
13	Pastor Alemán	M	3,5	44	Pointer	H	2
14	Pastor Alemán	M	3	45	Bretón	H	6
15	Cruzado	H	2	47	Schnauzer	H	7
16	Rottweiler	M	5	50	Husky	H	2
17	Pastor Alemán	H	5	55	Cruzado	H	2
18	Mastín	M	5,5	57	Cruzado	M	4
19	Dobermann	M	4,5	64	Pastor Alemán	M	5
20	Cocker	M	0,75	65	Presca canario	M	6
21	Bretón	H	5	67	Bretón	M	2,5
22	Pastor Alemán	M	5	68	Dobermann	H	4,5
23	Aguas español	H	1,25	101	Pointer	M	3
24	Cruzado	M	3	102	Cocker	H	9
25	Podenco	M	5,5	103	Schnauzer	M	5
26	Pastor Alemán	M	5	104	Collie	H	2
27	Pastor Alemán	M	5	105	Pastor Alemán	M	1,5
28	Gran Danés	H	4,5	106	Cruzado	M	5
29	Bretón	H	4,5	107	Bretón	M	2
30	Pastor Alemán	M	4	108	Husky	M	6
31	Braco Alemán	M	4	109	Boxer	H	1

Tabla 10.- Continúa en la siguiente página.

Perro	Raza	Sexo	Edad	Perro	Raza	Sexo	Edad
110	Fox Terrier	M	3	126	Pekinés	M	9
111	Doberman	M	3	127	Cruzado	H	7
112	Cruzado	H	6	128	Pointer	H	6
113	Pastor Alemán	H	3	129	Husky	M	2
114	Labrador	M	7	130	Pastor Alemán	M	8
115	Gran Danés	H	3	131	Mastín	M	5
116	Griffon	M	1	132	Doberman	M	3
117	Pastor Alemán	H	8	133	Cruzado	H	3
118	Pastor Belga	H	1	134	Yorkshire terrier	M	7
119	Pointer	H	7	135	Gran Danés	H	4
120	Mastín	M	3	136	Cruzado	M	6
121	Bull Terrier	M	9	137	Pastor Belga	H	6
122	Pit bull terrier	M	2	138	Cruzado	M	8,5
123	Setter irlandés	H	4	139	Galgo	M	3
124	Turco	H	2	140	Pointer	M	5
125	Mastín	H	4,5				

Tabla 10.- Continuación. Reseña de los perros con leishmaniosis en la prueba de ELISA para Ac anti-histonas. N = 93; M = 55; H = 37.

Material

Reactivos

- . Albúmina bovina libre de globulinas (Sigma immunochemicals).
- . Tween, 20 (Merck).
- . H₂O₂ al 35% (Merck).
- . Substrato peroxidasa: ABTS (sal diamónica del ácido 2,2' azino bis 3-etilbencillazolina-6-sulfanico; Sigma immunochemicals).
- . Biotina-X-NHS (éster N-OH-succinamido del ácido biotinil-aminocaproico; Boehringer Mannheim).

- . Conjugado extravidina-peroxidasa (Sigma immunochemicals).
- . Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma immunochemicals).
- . Histonas bovinas purificadas (Histone type II-A calf thymus H9250-100MG; Sigma Aldrich).

- . Buffer de adsorción o tapizado: buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6:

Na ₂ CO ₃	5,30 g
HCO ₃ Na	8,49 g
Agua destilada	1,50 l

- . Buffer de bloqueo:

Na ₂ HPO ₄	1,48 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
CINa	7,20 g
Albúmina bovina	5,00 g
Agua destilada	1,00 L

- . Buffer de dilución:

Na ₂ HPO ₄	1,48 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
CINa	7,20 g
Albúmina bovina	5,00 g
Tween, 20	1,00 ml
Agua destilada	1,00 L

. Buffer citrato fosfato pH 5,0:

Acido Cítrico (0,1 M)	1,00 l
Na ₂ HPO ₄ (0,1 M)	2,00 l

. Solución de sustrato ABTS

ABTS	50,00 mg
Buffer Citrato	100,00 ml
H ₂ O ₂ 35	100,00 µl

. Solución de lavado

Solución salina normal	
Tween, 20	0,1%

. Anticuerpos específicos anti-Ig caninas (ICN biomedicals)

- . IgG 1:150
- . IgM 1:200
- . IgA 1:100

Material de laboratorio

- . Micropipetas digitales regulables desde 2 a 100 microl, marcas Gilson y Nychirio.
- . Pipeta ajustable, 20-200 µl, multicanal modelo 851 (Socores).
- . Placas microtiter poliestireno Maxisorb (Nunk).
- . Lector de placas ELISA EAR400 (SLT Instruments).
- . Centrifuga Centrikon H-401 (Kontron).

. Tubo de diálisis

Método

. Biotinización de los Ac específicos

Se prepara, inmediatamente antes de usar, una solución (15-30 mg/ml) de biotina-X-NHS en DMSO fresco, recién destilado. Previamente se disuelven en PBS 50 mM pH 8,5 los anticuerpos a conjugar mediante diálisis frente agua destilada (4°C) durante 4-6 horas y posteriormente contra PBS 50 mM pH 8,5 durante toda la noche, con agitación continua suave, hasta eliminar completamente el PBS pH 7,2 donde se encontraban diluidos los anticuerpos.

A continuación añadimos la solución de biotina-X-NHS-DMSO en tal cantidad que mantengamos una molaridad 10 veces superior a la del Ac y con una relación de volumen entre la solución de Biotina-X-NHS-DMSO y nuestro Ac de 1:10 a 1:50. Conseguido esto, incubamos a T^a ambiente (22°C) durante 4 horas comprobando periódicamente que el pH de la reacción no desciende por debajo de 7. Pasado este tiempo sometemos la muestra a diálisis durante toda la noche frente a PBS pH 7,2 y realizando al menos 2 a 3 cambios de PBS. Finalmente centrifugamos el dializado durante 10 minutos a 8200 rpm y comprobamos mediante inmunoelectroforesis que los puntos de unión al Ag no han sido bloqueados por la biotina.

El conjugado se conserva a -20°C pero antes hay que congelarlo bruscamente a -70°C o mejor mediante un choque de frío en nitrógeno líquido.

. Desarrollo del método ELISA

Antes de iniciar el ensayo, se llevan a temperatura ambiente todos los reactivos.

1. Tapizado.

Diluir histonas en buffer carbonato-bicarbonato hasta concentración final de $5\ \mu\text{g/ml}$.

Pipetear $100\ \mu\text{l}$ en cada pocillo.

Incubar a 37° durante 2 horas.

2. Bloqueo.

Pipetear, $200\ \mu\text{l}$ de PBS-BSA 0,5%.

Incubar 2 horas a 37° .

3. Aplicación de las muestras.

Pipetear $100\ \mu\text{l}$ de suero diluido a 1:50 en buffer de dilución.

Incubar 1 hora a 37° .

4. Aplicación del conjugado.

Pipetear $100\ \mu\text{l}$ de anticuerpo anti IgG H+L biotinilado diluido al 1:800 en buffer de dilución. Incubar 1 hora a 37° .

5. Aplicación del revelador.

Pipetear 100 µl de extravidina-peroxidasa 1:2000 en buffer de dilución.

Incubar 1 hora a 37°.

6. Aplicación del substrato.

Pipetear 100 µl de substrato ABTS diluido en buffer citrato fosfato junto con H₂O₂ al 35% (10 µl por cada 10 ml de substrato).

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Leer a 405 nm.

7. Cálculo de los resultados.

En primer lugar se resta a cada muestra la densidad óptica (DO) de los controles negativos y se calcula la DO media para cada par de pocillos de una misma muestra. Se calculan las unidades ELISA de cada muestra dividiendo su DO media por la media $\pm 2 \times$ DE (desviación estándar) de los perros sanos (N = 20). Es decir, serán positivas aquellas muestras cuya DO media sea mayor que el límite superior del intervalo de confianza al 95% del grupo control. Las muestras se clasifican como negativas, débiles, moderadas o fuertemente positivas en función de la siguiente escala:

Negativa: < 1 unidad

Positivo débil: 1-1,5 unidades

Positivo moderado: 1,6-2,5 unidades

Positivo fuerte: > 2,5 unidades

CORRELACIÓN ENTRE NIVELES SÉRICOS DE ANA ANTI-HISTONAS Y GLOMERULONEFRITIS

Para estudiar la correlación entre los niveles séricos de ANA anti-histonas y los parámetros biopatológicos de glomerulonefritis se diseñó un estudio prospectivo. El diagnóstico de leishmaniosis y exploración clínica se realizó según lo indicado al inicio de esta sección de material y métodos. En estos animales se obtuvieron, además del hemograma y bioquímica sanguínea, muestras para análisis de orina. En el urianálisis se prestó especial atención a la determinación del cociente de proteína/creatinina (UPC) y a la valoración microscópica del sedimento urinario. La concentración de proteínas en orina se determinó mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1955). El UPC se obtuvo dividiendo la concentración de proteínas por la de creatinina en orina expresadas ambas en mg/dl (DiBartola, 2000). Como valor de corte para el diagnóstico de glomerulonefritis se estableció un UPC > 1.

En los animales incluidos en el estudio prospectivo se establecieron como criterios de exclusión aquellos de edad superior a 6 años, los que presentaban serología positiva para otras enfermedades infecciosas o síntomas poco frecuentes en leishmaniosis como síntomas cardiorrespiratorios o gastrointestinales o signos de proteinuria post-renal. En total se incluyeron 43 perros con leishmaniosis, 29 machos y 14 hembras, con edades comprendidas

entre 0,75 y 5,5 años. Los perros con leishmaniosis se dividieron en dos grupos según su *status* renal valorado a partir de los niveles séricos de creatinina y el cociente UPC. El Grupo I incluyó perros con síntomas clínicos de leishmaniosis y sin signos de glomerulonefritis. El Grupo II se reservó para animales con glomerulonefritis diagnosticada por la presencia de un cociente UPC >1 y una concentración sérica de creatinina > 1,3 mg/dl (Latimer et al., 2002).

PERRO	Raza	Sexo	Edad	Clínica
1	Pastor Alemán	M	4,5	O
2	Pastor Belga	H	5	O
5	Rottweiler	M	3,5	P
8	Caniche	M	4	O
9	Mastín	H	5	P
10	Podenco	M	2,5	O
11	Pastor Alemán	M	3	P
14	Pastor Alemán	M	3	P
15	Cruzado	H	2	O
16	Rottweiler	M	5	O
17	Pastor Alemán	H	5	O
18	Mastín	M	5,5	O
19	Dobermann	M	4,5	O
20	Cocker	M	0,75	P
21	Bretón	H	5	O
33	Boxer	H	2	O
34	Dobermann	H	3	P
25	Podenco	M	5,5	O

Tabla 11.- Grupo I. Perros con leishmaniosis y sin signos de glomerulonefritis. P = polisintomático; O = oligosintomático. N = 18.

PERRO	Raza	Sexo	Edad	Clínica
3	Pastor Alemán	M	4	P
4	Pastor Alemán	M	5	P
12	Gran Danés	M	2	P
13	Pastor Alemán	M	3,5	P
6	Labrador	H	4,5	O
7	Cruzado	H	4	O
22	Pastor Alemán	M	5	P
23	Aguas español	H	1,25	O
24	Cruzado	M	3	O
26	Pastor Alemán	M	5	P
27	Pastor Alemán	M	5	P
28	Gran Danés	H	4,5	P
29	Bretón	H	4,5	O
30	Pastor Alemán	M	4	P
31	Braco Alemán	M	4	P
32	Aguas español	M	5	P
35	Bóxer	M	4	O
36	Pastor Alemán	M	3	O
37	Galgo	H	2	P
38	Dobermann	M	5	P
39	Pit Bull terrier	M	1	P
40	Pointer	H	4	P
41	Pastor Alemán	M	2	O
42	Fox-terrier	M	1	P
43	Cocker	M	3	P

Tabla 12.- Grupo II. Perros con leishmaniosis y signos de glomerulonefritis. P = polisintomático; O = oligosintomático. N = 25.

Como grupo control se analizaron muestras de 50 perros sanos (22 machos y 28 hembras, con un rango de edad de 0,5 a 5 años). Los animales eran donantes de sangre y perros sanos de clientes de nuestro hospital que accedieron a la inclusión en el estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada una de las variables continuas estudiadas se obtuvieron los parámetros estadísticos descriptivos pertinentes. Se estableció la correlación positiva entre títulos de ANA determinados sobre cortes de hígado de rata y células Hep-2. La correlación entre títulos de ANA por IFI en células Hep-2 y niveles de anticuerpos anti-histonas se evaluó mediante la prueba de correlación no paramétrica de Spearman. Mediante una prueba t se compararon los valores de densidad óptica obtenidos en el test ELISA para ANA anti-histonas entre perros sanos y con leishmaniosis. La proporción de animales con títulos elevados de anticuerpos anti-histonas en grupos con diferente gravedad clínica se comparó mediante una prueba de χ^2 . La proporción de animales con niveles de ANA anti-histonas elevados entre los grupos I y II de perros con leishmaniosis se comparó mediante un test exacto de Fisher. La media de ANA anti-histonas en ambos grupos se comparó mediante un test de Mann-Whitney. La relación entre los ANA anti-histonas y el cociente UPC y niveles séricos de creatinina se estudió mediante el coeficiente de correlación de Pearson. También se calcularon los valores predictivos positivos y negativos de los ANA anti-histonas para el desarrollo de glomerulonefritis. Todos los cálculos estadísticos y gráficas se realizaron mediante el software GraphPad Prism versión 5.0 para Windows.

RESULTADOS

PREVALENCIA DE ANA EN LA LEISHMANIOSIS CANINA

Determinación de ANA en criocortes de hígado de rata

En total, la determinación se realizó en 60 muestras de perros con leishmaniosis. Las muestras que presentaron fluorescencia a una dilución de 1:20 se consideraron positivas (Tabla 13). No se realizaron diluciones posteriores para la titulación definitiva de las muestras positivas.

Perro	Título	Perro	Título	Perro	Título
1	+	32	-	80	-
2	+	33	-	81	-
3	+	34	+	82	-
4	+	59	-	83	-
5	+	60	-	84	-
6	+	61	-	85	-
7	+	62	-	86	-
8	+	63	+	87	-
9	+	64	+	88	-
10	+	69	-	89	-
11	+	70	-	90	-
18	-	71	-	91	-
19	-	72	-	92	-
20	-	73	-	93	-
24	-	74	-	94	-
25	-	75	-	95	-
26	-	76	-	96	-
27	-	77	-	97	-
30	-	78	-	98	-
31	-	79	-	99	-

Tabla 13.- Resultados de los perros con leishmaniosis en la prueba de IFI con criocortes de hígado de rata.

La prevalencia de ANA fue del 23,3% (14 muestras positivas de 60 analizadas). Los patrones de inmunofluorescencia sobre criocortes de hígado de rata son poco específicos (Bradwell et al., 1995) por lo que no se han incluido como resultado. No obstante, el patrón predominante fue el nuclear.

Determinación de ANA en células Hep-2

Se realizó IFI sobre células Hep-2 en un total de 67 perros con leishmaniosis (Tabla 14). En 35 animales (52,23%) se obtuvo un título $\geq 1:40$ y por tanto se consideraron positivos. Los títulos oscilaron entre 1:40 (18 perros) y 1:640 (1 perro). Tres muestras alcanzaron un título de 1:80, otras 3 muestras de 1:160 y en 10 perros se obtuvo un título final de 1:320.

Sólo tres tipos de patrones de inmunofluorescencia pudieron ser definidos claramente: nuclear, nucleolar y citoplasmático.

La mayoría de los perros presentaron sólo un tipo de patrón. El patrón nuclear fue el patrón predominante al estar presente en 15 animales, otros 11 presentaron un patrón citoplasmático y finalmente en 6 animales el patrón fue nucleolar. En 3 ocasiones, las muestras presentaron un patrón mixto que siempre fue una combinación de patrón nuclear y citoplasmático.

Perro Nº	Título	Patrón	Perro	Título	Patrón
1	<40		35	40	N
2	<40		36	40	N
3	<40		37	320	C
4	640	N	38	320	N
5	40	C	39	40	N
6	<40		40	160	C
7	40	C	41	80	N
8	40	No	42	320	N+C
9	40	No	43	<40	
10	<40		44	<40	
11	40	No	45	<40	
12	40	No	46	<40	
13	320	C	47	<40	
14	40	N	48	<40	
15	40	No	49	<40	
16	320	N	50	<40	
17	40	C	51	<40	
18	40	N+C	52	<40	
19	40	N+C	53	<40	
20	320	N	54	<40	
21	40	C	55	<40	
22	320	N	56	<40	
23	80	No	57	<40	
24	40	C	58	<40	
25	40	C	59	<40	
26	160	N	60	<40	
27	320	N	61	<40	
28	320	N	62	<40	
29	320	N	63	<40	
30	160	N	64	<40	
31	80	C	65	<40	
32	40	C	66	<40	
33	80	C	67	<40	
34	40	No			

Tabla 14.- Resultados de los perros con leishmaniosis en la prueba de IFI con células Hep-2. (N=Nuclear; No=Nucleolar; C= Citoplasmático).

El patrón nuclear se caracterizó por ser del tipo homogéneo (Figura 1). La fluorescencia era de carácter difuso y uniforme sin apreciarse mayor intensidad en la región externa del núcleo.

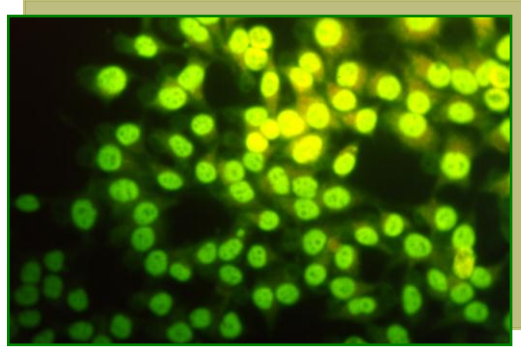


Figura 1.- Patrón nuclear. El citoplasma no presenta fluorescencia significativa y dentro del núcleo los nucleolos son claramente negativos.

El patrón nucleolar fue también del tipo homogéneo (Figura 2). La fluorescencia se presentó sobre todo en el nucleolo y estaba ausente en la región de cromatina condensada del núcleo.

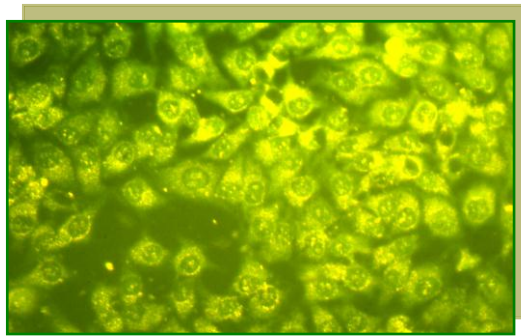


Figura 2.- Patrón mixto nucleolar y citoplasmático, sólo el núcleo aparece sin inmunofluorescencia.

El patrón citoplasmático fue de tipo granular (Figura 2). Este patrón no se correspondía con otros tipos de patrones como los patrones mitocondrial, lisosomal o endoplásmico. Siguiendo la clasificación de Bradwell et al. (1995), el patrón citoplasmático se correspondía con ribosómico o con el patrón específico de la proteína de reconocimiento de señal común a múltiples receptores citoplasmáticos.

Correlación positiva entre las técnicas de Inmunofluorescencia

La correlación positiva (coincidencia de resultados positivos) entre ambas técnicas se estableció a partir de 24 muestras que habían obtenido un título positivo en al menos una de las dos técnicas empleadas (Tabla 15). No se incluyeron 4 muestras con resultados negativos en ambas técnicas (correlación negativa) pues su interés clínico es menor y aumentarían notablemente el grado de correlación total.

Las dos técnicas de inmunofluorescencia mostraron una correlación positiva en 7 de las 24 (29%) muestras analizadas. La correlación positiva representa el porcentaje de muestras que fueron positivas en ambos métodos.

En 11 perros (45,8%), las muestras alcanzaron títulos positivos sólo sobre células Hep-2, mientras que 6 muestras (25%) fueron positivas sólo sobre las células de hígado de rata.

Perro	IFI-hígado	IFI-Hep-2
1	+	-
2	+	-
3	+	-
4	+	+
5	+	+
6	+	-
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	-
11	+	+
18	-	+
19	-	+
20	-	+
24	-	+
25	-	+
26	-	+
27	-	+
30	-	+
31	-	+
32	-	+
33	-	+
34	+	+
63	+	-

Tabla 15.- Resultados obtenidos en muestras procesadas por ambas técnicas de inmunofluorescencia. N=24.

ISOTIPOS DE ANA EN LA LEISHMANIOSIS CANINA

En 14 de los perros con títulos positivos de ANA sobre criocortes de hígado de rata, se determinaron los isotipos de

inmunoglobulinas que constituían los ANA (Tabla 16) empleando el mismo sustrato. Para ello se introdujo un anticuerpo específico de la cadena pesada de cada inmunoglobulina y después de este paso adicional se añadió el correspondiente anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína.

Los ANA de isotipo IgM estuvieron presentes en 13 de las 14 muestras estudiadas, con una titulación máxima de 1:50. Por el contrario, los ANA del isotipo IgA sólo alcanzaron títulos positivos en 4 de las 14 muestras y en ningún caso con un título superior a 1:20. Los ANA del isotipo IgG se detectaron en 7 animales y fueron los que alcanzaron títulos más elevados, de hasta 1:100 y 1:200 en dos de los perros incluidos en el estudio. El resto de animales con ANA IgG presentaron títulos bajos de 1:20 y en 7 de ellos no se detectaron en concentraciones significativas.

Sólo en 4 de los 14 perros estudiados, los ANA correspondían a un solo isotipo. La mayoría de animales presentaron ANA de dos isotipos diferentes, por lo general IgG e IgM y en ningún caso se detectó la presencia de los 3 isotipos en una misma muestra. Seis perros presentaron ANA de los isotipos IgG e IgM, cuatro presentaron al mismo tiempo ANA de los isotipos IgM e IgA, otro perro presentaba únicamente ANA IgG y finalmente 3 perros presentaron únicamente ANA del isotipo IgM.

Perro	IgG	IgM	IgA
1	-	20	-
2	-	20	20
3	-	50	-
4	20	20	-
5	200	20	-
6	20	50	-
7	-	20	20
8	20	20	-
9	-	50	20
10	100	50	-
11	20	-	-
34	-	50	20
100		20	
101	20	20	-

Tabla 16.- Título de los diferentes isotipos en perros con leishmaniosis ANA positivos sobre criocortes de rata. Los títulos superiores a 1:20 se consideran positivos.

RELACIÓN ENTRE ISOTIPOS DE ANA Y HALLAZGOS CLÍNICOS

Se analizó la combinación de isotipos de ANA y la presencia de lesiones en los órganos diana para la precipitación de CIC (Tabla 17). Sólo 4 de los 14 perros investigados habían desarrollado glomerulonefritis y todos ellos presentaban la combinación IgG e IgM de ANA. Sin embargo, otros dos perros con el mismo patrón de ANA no desarrollaron síntomas de glomerulonefritis.

La combinación IgG+IgM parece estar asociada a un mayor potencial patogénico ya que la mayoría de perros con este patrón presentaron más de una localización lesional.

Isotipos ANA	Número de perros	Lesiones			
		Dermatitis	Glomerulonefritis	Uveitis	Artritis
IgM	3	2	0	3	1
IgG	1	0	0	0	0
IgG+IgM	6	5	4	1	0
IgA+IgM	4	4	0	2	1
Total	14	11	4	6	2

Tabla 17.- Asociación entre patrones de ANA y lesiones presumiblemente asociadas a precipitación de inmunocomplejos. Algunos perros presentaron lesiones en más de una localización.

Los ANA del isotipo IgM siempre estaban asociados con afección renal, ocular, cutánea o articular, mientras que los ANA de los isotipos IgG e IgA se asociaron con lesiones en estos órganos de forma variable. Un perro con ANA de tipo IgG no presentó lesiones en ninguno de estos órganos considerados diana en las reacciones de hipersensibilidad de tipo III por depósito de inmunocomplejos.

ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA DE LOS ANA EN LA LEISHMANIOSIS CANINA

Determinación de ANA anti ADN de doble cadena: inmunofluorescencia sobre *Crithidia*.

En 34 perros con leishmaniosis se estudió la presencia de ANA específicos para ADN de doble cadena mediante IFI sobre protozoos del género *Crithidia* (Tabla 18). Se seleccionaron perros con títulos positivos por IFI sobre criocortes de hígado de rata, células Hep2 o en ambas. Los títulos fueron negativos en todos los animales salvo en el perro número 23 que presentó fluorescencia con un título de 1:80.

Perro	Título	Perro	Título
1	-	18	-
2	-	19	-
3	-	20	-
4	-	21	-
5	-	22	-
6	-	23	80
7	-	24	-
8	-	25	-
9	-	26	-
10	-	27	-
11	-	28	-
12	-	29	-
13	-	30	-
14	-	31	-
15	-	32	-
16	-	33	-
17	-	34	-

Tabla 18.- Resultados de los perros con leishmaniosis en la prueba de IFI sobre células de *Crithidia*. A pesar de que todos los análisis salvo 1 fueron negativos, la tabla se ha incluido para dar información de los animales analizados.

En el animal positivo la fluorescencia se detectó específicamente a nivel del quinoplasto y más débilmente sobre el núcleo (Figura 3). En las muestras negativas no hubo fluorescencia,

pero la gran mayoría de ellas presentaba fluorescencia sobre el núcleo del protozoo y no sobre el quinetooplasto, lo que indica negatividad.

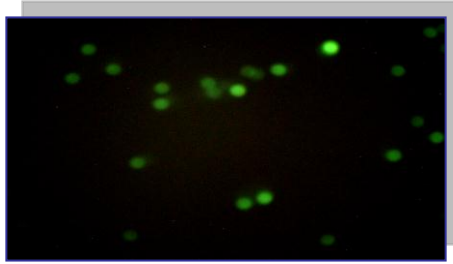


Figura 3.- Inmunofluorescencia sobre *Crithidia*. El quinetooplasto aparece marcado con más intensidad que el núcleo.

Determinación de ANA frente a antígenos nucleares solubles (ENA)

Se analizaron las 34 muestras usadas para la determinación de ANA-dc, para buscar la presencia de anticuerpos frente a antígenos nucleares nRNP y Sm. A diferencia de los controles positivos (Figura 4), ninguna de las muestras analizadas produjo bandas de precipitación apreciables. Todas las muestras se consideraron negativas.



Figura 4.- Líneas de precipitación para los autoantígenos ENA del tipo Sm (línea superior) y RNP (línea inferior).

Perro	Anti Sm	Anti-nRNP
1	(-)	(-)
2	(-)	(-)
3	(-)	(-)
4	(-)	(-)
5	(-)	(-)
6	(-)	(-)
7	(-)	(-)
8	(-)	(-)
9	(-)	(-)
10	(-)	(-)
11	(-)	(-)
12	(-)	(-)
13	(-)	(-)
14	(-)	(-)
15	(-)	(-)
16	(-)	(-)
17	(-)	(-)
18	(-)	(-)
19	(-)	(-)
20	(-)	(-)
21	(-)	(-)
22	(-)	(-)
23	(-)	(-)
24	(-)	(-)
25	(-)	(-)
26	(-)	(-)
27	(-)	(-)
28	(-)	(-)
29	(-)	(-)
30	(-)	(-)
31	(-)	(-)
32	(-)	(-)
33	(-)	(-)
34	(-)	(-)

Tabla 19.- Resultados de los perros con leishmaniosis en la prueba de inmunodifusión doble frente a antígenos nucleares nRNP y Sm. Aunque todos los análisis fueron negativos, la tabla se incluye para dar información de los animales analizados.

Determinación de ANA frente a histonas

Un número total de 93 muestras de animales enfermos y 50 animales sanos fueron analizadas para detectar la presencia de ANA frente a histonas. Todos los sueros se incluyeron por duplicado. Las lecturas de densidad óptica (DO), se dividieron por dos veces la desviación estándar obtenida en el grupo control de perros sanos (Tabla, 20), para obtener unidades ELISA (Henriksson et al., 1998). Las reacciones < 1 unidad se consideraron negativas. Las reacciones positivas se clasificaron como débiles (1-1,5 unidades), moderadas (1,6-2,5 unidades) y fuertes (> 2,5 unidades) (Tabla 21). Los estadísticos descriptivos de ambos grupos se recogen en la Tabla 22.

Perro	Densidad Optica	Perro	Densidad Optica	Perro	Densidad Optica
1	0,4240	18	0,7277	35	0,6991
2	0,5211	19	0,4970	36	0,4176
3	0,4350	20	0,6494	37	0,2354
4	0,7215	21	0,8640	38	0,3198
5	0,2600	22	0,2510	39	0,6925
6	0,5222	23	0,4209	40	0,4259
7	0,4229	24	0,3503	41	0,5333
8	0,3230	25	0,3543	42	0,5225
9	0,2850	26	0,7227	43	0,8835
10	0,4370	27	0,4610	44	0,7285
11	0,8610	28	0,5198	45	0,3440
12	0,3700	29	0,4946	46	0,5508
13	0,2430	30	0,3203	47	0,4612
14	0,3282	31	0,5462	48	0,4255
15	0,2401	32	0,8629	49	0,6614
16	0,3710	33	0,4168	50	0,7998
17	0,8307	34	0,3479		

Tabla 20.- Resultados del ELISA anti-histonas en perros sanos (N=50).

Perro	DO media	Unidades ELISA	Perro	DO media	Unidades ELISA	Perro	DO media	Unidades ELISA
1	0,7629	0,8695	32	2,7741	3,1617	110	0,341	0,3886
2	1,4134	1,6109	33	0,8662	0,9873	111	0,5140	0,5857
3	1,5123	1,7236	34	1,4786	1,6852	112	0,7825	0,8916
4	3,2640	3,7201	35	1,3280	1,5136	113	0,803	0,9150
5	0,8629	0,9834	36	2,5494	2,9056	114	1,0305	1,1742
6	1,7078	1,9465	37	1,3134	1,4970	115	0,3425	0,3903
7	1,6067	2,0041	38	1,7831	2,0323	116	0,4	0,4558
8	1,6314	1,8594	39	2,9887	3,4063	117	0,658	0,7498
9	0,8674	0,9886	40	2,4786	2,8249	118	0,4515	0,5145
10	0,8910	1,0155	41	1,8314	2,0873	119	0,294	0,3350
11	0,9606	1,0949	42	1,6943	1,9311	120	0,494	0,5629
12	2,3932	2,7276	43	2,9662	3,3807	121	0,645	0,7350
13	2,2719	2,5893	44	0,183	0,2085	122	1,0205	1,1628
14	1,7651	2,0118	45	0,394	0,4490	123	0,459	0,5230
15	0,9831	1,1205	47	0,494	0,5629	124	0,468	0,5333
16	1,4741	1,6801	50	1,065	1,2135	125	0,2755	0,3139
17	1,4629	1,6673	55	0,241	0,2746	126	0,972	1,1075
18	2,0853	2,3767	57	1,011	1,1520	127	0,373	0,4250
19	0,7662	0,8733	64	0,05	0,0570	128	0,399	0,4546
20	1,1550	1,3164	65	0,4375	0,4985	129	0,393	0,4478
21	1,1101	1,2652	67	0,3855	0,4393	130	0,411	0,4683
22	1,7584	2,0041	68	0,384	0,4376	131	0,5555	0,6330
23	1,8044	2,0566*	101	0,0535	0,0610	132	0,6185	0,7048
24	2,3157	2,6393	102	0,76	0,8660	133	0,894	1,0186
25	1,0146	1,1563	103	0,386	0,4398	134	0,2445	0,2786
26	2,2900	2,6099	104	0,3965	0,4518	135	0,213	0,2427
27	1,7797	2,0284	105	0,4275	0,4871	136	0,126	0,1436
28	1,9640	2,2384	106	0,3405	0,3880	137	0,2335	0,2661
29	0,4112	0,4686	107	0,656	0,7475	138	0,286	0,3259
30	1,2876	1,4675	108	0,715	0,8147	139	0,629	0,7167
31	2,2191	2,5291	109	0,483	0,5504	140	0,3395	0,3869

Tabla 21.- Resultados del método ELISA para detección de ANA frente a histonas (N=93). Los perros con unidades ELISA >1 se consideran positivos;*única muestra positiva en la IFI sobre *Crithidia*. Las reacciones positivas aparecen sombreadas en gris.

Del total de muestras de perros con leishmaniosis analizadas (N=93), 43 muestras (46.23%) presentaron una concentración de anticuerpos IgG anti-histonas elevada. Un tercio aproximadamente (32,5%) de las reacciones positivas se clasificaron como positivos débiles (N = 14); en 19 perros (44,18%) las reacciones se consideraron moderadas y 10 perros (23,2%) presentaron concentraciones consideradas como altas según la escala establecida.

	DO Leishmaniosis	DO Sanos
Número de valores	93	51
Mínimo	0,0500	0,2354
Percentil 25%	0,3995	0,3479
Mediana	0,8030	0,4370
Percentil 75%	1,560	0,6614
Máximo	3,264	0,8835
Media	1,036	0,4974
SD	0,7711	0,1901
SDE	0,07996	0,02662

Tabla 22.- Estadísticos descriptivos de los valores de DO obtenidos en perros con leishmaniosis y perros sanos en la prueba ELISA para la detección de anticuerpos anti-histonas. Las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas ($P < 0,0001$; prueba t, con dos colas).

En 23 muestras se determinaron los títulos de ANA sobre células Hep-2 y también los niveles de ANA anti-histonas. La correlación entre ambas variables no fue estadísticamente significativa (coeficiente de correlación de Spearman $r = 0,3036$).

CORRELACIÓN ENTRE ANTICUERPOS ANTI-HISTONAS Y GLOMERULONEFRITIS

Parte de los animales estudiados en el apartado anterior pudieron incluirse de forma prospectiva para estudiar la correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-histonas y parámetros clinicopatológicos de función renal, fundamentalmente las concentraciones de creatinina sérica y el cociente en orina de proteínas y creatinina (UPC).

Tal y como se explica en la sección de material y métodos, los perros con leishmaniosis y parámetros renales normales fueron agrupados en el Grupo I (Tabla 23), mientras que todos los perros con leishmaniosis, cociente UPC > 1 y creatininemia $> 1,3$ mg/dl fueron diagnosticados con glomerulonefritis y agrupados en el Grupo II (Tabla 24).

PERRO	BUN mg/dl	Creatinina mg/dl	UPC	Proteínas totales g/dl	AHA DO	AHA unid. ELISA
1	40	0,9	0,74	8,4	0,7629	0,8695
2	24	0,95	0,49	7,8	1,4134	1,6109
5	50	1,03	0,57	6,9	0,8629	0,9834
8	30	0,85	0,81	9,2	1,6314	1,8594
9	27	0,98	0,71	12	0,8674	0,9886
10	20	0,81	0,44	9,2	0,8910	1,0155
11	70	1,15	0,5	7,9	0,9606	1,0949
14	55	0,75	0,55	8,9	1,7651	2,0118
15	30	0,65	0,39	7,9	0,9831	1,1205
16	24	1,24	0,59	12,5	1,4741	1,6801
17	25	0,92	0,4	9,8	1,4629	1,6673
18	14	0,54	0,33	11	2,0853	2,3767
19	37	0,77	0,28	6	0,7662	0,8733
20	28	0,97	0,43	8,1	1,1550	1,3164
21	14	1,05	0,35	8,2	1,1101	1,2652
33	14	0,78	0,51	7,4	0,8662	0,9873
34	65	1,2	0,69	8,3	1,4786	1,6852
25	25	0,9	0,52	9,1	1,0146	1,1563

Tabla 23.- Grupo I. Parámetros de función renal estudiados en perros con leishmaniosis sin signos de glomerulonefritis (N=18). AHA = anti-histone antibodies.

PERRO	BUN mg/dl	Creatinina mg/dl	UPC	Proteínas totales g/dl	AHA DO	AHA unid. ELISA
3	105	1,35	1,09	5,3	1,5123	1,7236
4	600	10	8,48	9,7	3,2640	3,7201
12	94	1,47	2,4	7,2	2,3932	2,7276
13	60	2,93	3,41	11,4	2,2719	2,5893
6	14	1,35	2,55	10	1,7078	1,9465
7	100	4,93	4,77	7,1	1,6067	1,8312
22	70	1,45	3,1	9,2	1,7584	2,0041
23	88	4,5	2,43	10	1,8044	2,0566
24	125	1,4	1,78	10,2	2,3157	2,6393
26	240	1,75	2,19	9,7	2,29	2,6099
27	340	2,8	13,5	8,4	1,7797	2,0284
28	420	5,1	2,3	12	1,9640	2,2384
29	80	5,7	1,6	7,6	0,4112	0,4686
30	102	3,5	3,9	8,7	1,2876	1,4675
31	230	2,75	3,15	7,8	2,2191	2,5291
32	90	1,8	2,13	9,5	2,7741	3,1617
35	50	4,35	2,22	8,2	1,3280	1,5136
36	35	1,5	1,25	7,4	2,5494	2,9056
37	420	5,6	6,38	11,3	1,3134	1,4970
38	360	3,9	24,2	9,5	1,7831	2,0323
39	90	1,8	6,72	10,1	2,9887	3,4063
40	250	1,7	4,3	10,5	2,4786	2,8249
41	60	1,55	1,15	8,6	1,8314	2,0873
42	320	4,9	4,63	7,7	1,6943	1,9311
43	100	1,35	3,95	11,5	2,9662	3,3807

Tabla 24.- Grupo II. Parámetros de función renal estudiados en perros con leishmaniosis con signos de glomerulonefritis (N=25).

Todos los perros con leishmaniosis eran sintomáticos pero se podía diferenciar entre aquellos perros denominados “polisintomáticos” que presentaban muchos de los signos clínicos típicos de la enfermedad (pérdida de peso, linfadenopatía, úlceras cutáneas, seborrea seca, onicodistrofia, queratoconjuntivitis, etc), frente a otros que se podían considerar “oligosintomáticos” al presentar en el momento del diagnóstico sólo uno o varios síntomas de la enfermedad, principalmente pérdida de peso y linfadenopatía. Siguiendo esta sencilla clasificación en función del número de signos clínicos, se estableció en cada grupo un cociente de perros polisintomáticos frente a perros oligosintomáticos. En el Grupo I el cociente fue de 0,5 (6/12) predominando por tanto los perros oligosintomáticos. En el Grupo II se produjo la situación inversa con un cociente de 2,12 (17/8), predominando por tanto los perros polisintomáticos frente a los oligosintomáticos.

Como era de esperar, la concentración sérica de BUN y creatinina eran superiores en el grupo de perros con UPC elevado. Las tablas 25 y 26 muestran los parámetros estadísticos descriptivos de las variables estudiadas en ambos grupos.

Estadísticos descriptivos	BUN mg/dl	Creatinina mg/dl	UPC	Proteínas totales g/dl	AHA unid. ELISA
Percentil 25%	23,00	0,7775	0,3975	7,875	0,9883
Mediana	27,50	0,9100	0,5050	8,350	1,211
Percentil 75%	42,50	1,035	0,6150	9,350	1,681
Máximo	70,00	1,240	0,8100	12,50	2,377
Media	32,89	0,9133	0,5167	8,811	1,365
DE	16,89	0,1839	0,1486	1,671	0,4384
SDE	3,982	0,04335	0,03503	0,3939	0,1033
Límite inferior del intervalo de confianza de la media al 95%.	24,49	0,8219	0,4428	7,980	1,147
Límite superior del intervalo de confianza de la media al 95%.	41,29	1,005	0,5906	9,642	1,583
Test de normalidad KS					
Distancia KS	0,2346	0,08222	0,1022	0,1858	0,1826
Valor P	0,0099	P > 0,10	P > 0,10	P > 0,10	P > 0,10
¿Pasó el test de normalidad ($\alpha= 0.05$)?	No	Sí	Sí	Sí	Sí

Tabla 25.- Estadísticos descriptivos de los parámetros de función renal en perros con leishmaniosis sin glomerulonefritis (N=18).

Estadísticos descriptivos	BUN mg/dl	Creatinina mg/dl	UPC	Proteínas totales g/dl	AHA unid. ELISA
Percentil 25%	1,485	2,160	7,750	1,881	1,485
Mediana	2,750	3,100	9,500	2,087	2,750
Percentil 75%	4,700	4,700	10,15	2,776	4,700
Máximo	10,00	24,20	12,00	3,720	10,00
Media	3,177	4,543	9,144	2,293	3,177
DE	2,094	4,924	1,628	0,7299	2,094
SDE	0,4187	0,9847	0,3257	0,1460	0,4187
Límite inferior del intervalo de confianza de la media al 95%.	2,313	2,511	8,472	1,992	2,313
Límite superior del intervalo de confianza de la media al 95%.	4,041	6,576	9,816	2,594	4,041
Test de normalidad KS					
Distancia KS	0,2246	0,2816	0,1065	0,1309	0,2246
Valor P	0,0021	P<0,0001	P > 0,10	P > 0,10	0,0021
¿Pasó el test de normalidad ($\alpha=0.05$)?	No	No	Sí	Sí	No

Tabla 26.- Estadísticos descriptivos de los parámetros de función renal en perros con leishmaniosis y glomerulonefritis (N=25).

No existen estándares de referencia con una concentración conocida de anticuerpos anti-histonas. Para detectar una elevación de anticuerpos anti-histonas empleamos los valores de densidad óptica de un grupo amplio de perros sanos como nivel basal. La DO media y desviación estándar (DE) del grupo control fueron $0,4974 \pm 0,1901$. El valor superior del intervalo de confianza (media ± 2 DE) de densidades ópticas obtenido en el grupo de perros sanos se hizo corresponder con una unidad ELISA. Las densidades ópticas de cada muestra fueron divididas por el valor de una unidad ELISA (0,8776) para convertirlas en unidades ELISA.

En el Grupo I, 5 perros fueron negativos (< 1 unidad ELISA), 6 perros desarrollaron reacciones débiles (1-1,5 unidades) y 7 perros tuvieron reacciones moderadas (1,6 – 2,5 unidades). En los perros con glomerulonefritis, sólo 1 perro obtuvo un resultado negativo, 2 perros tuvieron reacciones positivas débiles, 10 perros alcanzaron niveles moderadamente elevados y 12 perros alcanzaron niveles muy elevados ($> 2,5$ unidades). En general, 22 perros de este grupo (88%) tenían niveles altos (reacciones moderadas y fuertes) de anticuerpos anti-histonas, mientras que solo 7 perros (38,8%) del grupo I alcanzaron niveles similares. La Figura 5, muestra la distribución de niveles de anticuerpos anti-histonas (AHA) en los 3 grupos de perros.

Estadísticamente, la proporción de perros con niveles elevados de anticuerpos anti-histonas fue significativamente mayor en el grupo

de perros con signos de glomerulonefritis ($P < 0,0011$; test exacto de Fisher con dos colas). Del mismo modo, cuando se compararon las concentraciones de anticuerpos anti-histonas expresadas en unidades ELISA, las diferencias fueron también estadísticamente significativas (test de Mann-Whitney), con una concentración media superior en el grupo de perros con leishmaniosis y glomerulonefritis.

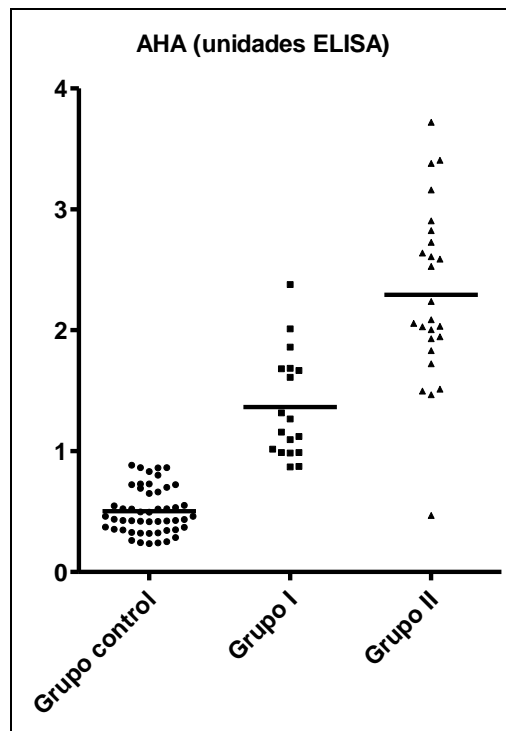


Figura 5.- Distribución de niveles de anticuerpos anti-histonas (AHA) en perros sanos (grupo control), perros con leishmaniosis sin glomerulonefritis y con glomerulonefritis. Las barras horizontales indican el valor medio.

La relación entre los niveles de anticuerpos anti-histonas, cociente UPC y concentraciones séricas de creatinina se analizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (Tabla 27).

Variabes	Nº. de muestras	Coeficiente de correlación (<i>r</i>)	Nivel de significación
Grupos I y II	43		
Creatinina y AHA		0,2585	0,0942
UPC y AHA		0,3058	0,0461*
Grupo I	18		
Creatinina y AHA		-0,3586	0,1440
UPC y AHA		0,0108	0,9659
Grupo II	25		
Creatinina y AHA		-0,0969	0,6447
UPC y AHA		0,3344	0,1023

Tabla 27.- Coeficiente de correlación entre creatinina sérica, cociente UPC y anticuerpos anti-histonas (AHA) en perros con leishmaniosis (test de correlación de Pearson). * Estadísticamente significativo ($P < 0.05$).

Los niveles de anticuerpos anti-histonas y el cociente UPC presentaron un coeficiente de correlación positivo moderado ($r = 0,3058$) y estadísticamente significativo ($P = 0,0461$) cuando se analizaron conjuntamente los perros de ambos grupos (Figura 6). Sin embargo no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones séricas de creatinina y los niveles de anticuerpos anti-histonas. Igualmente, cuando ambos grupos se analizaron separadamente, no se encontraron coeficientes de correlación estadísticamente significativos.

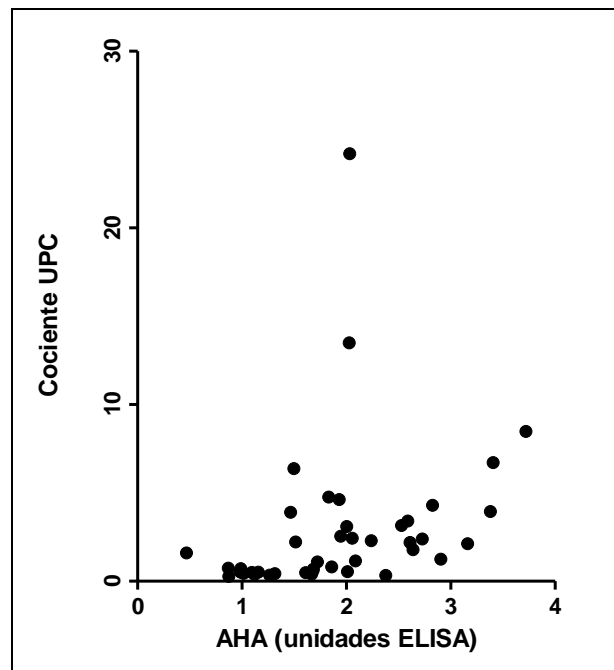


Figura 6.- Diagrama de puntos para ilustrar la correlación entre los valores de AHA y UPC. $r = 0,3058$, ($P = 0,0461$).

El valor predictivo positivo de niveles elevados de anticuerpos anti-histonas como riesgo del desarrollo de glomerulonefritis fue del 88%. Según este valor, el 88% de perros con leishmaniosis y niveles elevados de anticuerpos anti-histonas desarrollarían glomerulonefritis. Por el contrario, el valor predictivo negativo de este parámetro solo alcanzó el 61,11% (Tabla 28).

	AHA (+)	AHA (-)	TOTAL
Glomerulonefritis UPC>1 (+)	22	3	25
No Glomerulonefritis UPC<1 (-)	7	11	18
TOTAL	29	14	43

Tabla 28.- Tabla de contingencia empleada para el cálculo de valores predictivos positivos y negativos de la variable anticuerpos anti-histonas (AHA) sobre el desarrollo de glomerulonefritis en perros con leishmaniosis.

Para estudiar la relación entre los niveles de ANA anti-histonas y los síntomas clínicos presentados por los perros con leishmaniosis se construyó una tabla de contingencia y se comparó la proporción de perros oligosintomáticos y polisintomáticos entre los animales con reacciones moderadas/fuertes (>1,5 unidades ELISA) y reacciones negativas/positivas débiles (< 1,5 unidades ELISA). Los resultados del test exacto de Fisher indicaron que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de ANA anti-histonas de los perros oligosintomáticos y polisintomáticos (Tabla 29).

	Oligosintomáticos	Polisintomáticos	Totales
Reacción moderada/fuerte	12 (28%)	17 (40%)	19 (67%)
Reacción negativa/débil	8 (19%)	6 (14%)	14 (33%)
Totales	20 (47%)	23 (53%)	43 (100%)

Tabla 29.- Tabla de contingencia para comparar la proporción de niveles elevados de ANA anti-histonas en perros con leishmaniosis y diferente intensidad sintomática.

DISCUSIÓN

En general, nuestros resultados demuestran que los ANA son relativamente prevalentes en la leishmaniosis canina. Especialmente en el caso de los ANA anti-histonas, su importancia patogénica en el desarrollo de lesiones glomerulares es significativa aunque evidentemente otros factores patogénicos como la presencia del propio parásito y la reacción inflamatoria asociada son más importantes. No obstante, está claro que en las lesiones y síntomas característicos de la leishmaniosis canina existe un componente de autoinmunidad, del que los ANA son un fenómeno destacado.

En el diagnóstico diferencial de la leishmaniosis canina deben incluirse otras enfermedades infecciosas pero también procesos de origen inmunomediado como el lupus eritematoso sistémico, el lupus eritematoso discoide, el pénfigo eritematoso, pénfigo foliáceo y todos los cuadros clínicos asociados con vasculitis, incluyendo uveitis, glomerulonefritis y dermatitis en regiones cutáneas acras como extremidades distales y extremo del pabellón auricular.

La presencia de ANA es el sello de identidad de las enfermedades reumáticas. El prototipo de este tipo de enfermedades autoinmunes es el LES donde se ven afectados multitud de órganos y sistemas (Tan, 1982). En el caso del perro existe un paralelismo clínico entre el LES y la leishmaniosis canina, que puede cursar con muchos de los síntomas característicos del LES y otras enfermedades reumáticas indicando que compartían mecanismos

inmunopatogénicos. Nuestros resultados demuestran que, aparte de la participación de CIC ya probada en trabajos previos, el desarrollo de ANA, especialmente anti-histonas, es otro mecanismo inmunopatogénico implicado en la leishmaniosis canina que puede ser por tanto calificada como una enfermedad inmunomediada secundaria (Holian et al., 1975; Gorman y Werner, 1986; Day, 1998).

El componente autoinmune de la leishmaniosis canina estaría relacionado con la respuesta humoral de cada animal. Existen básicamente dos posibilidades: una respuesta de tipo Th1 y otra de tipo Th2. El fenómeno Th1/Th2 hace referencia al hecho de que hay dos subtipos de células T *helper* o auxiliares (los llamados linfocitos Th1 y Th2), que selectivamente disparan dos tipos diametralmente opuestos de respuesta inmune. Cada una de estas subpoblaciones se caracteriza por segregar un grupo totalmente diferente de citocinas con efectos antagónicos. El tipo Th1 desarrolla una respuesta inmune celular con mínima producción de anticuerpos, mientras que el tipo Th2 de linfocitos T desarrolla una respuesta inmune humoral. Su acción es mutuamente excluyente y provoca que en muchas enfermedades exista un predominio de la inmunidad humoral sobre la celular y viceversa (Stern et al., 1988; Day, 1998). En las respuestas de tipo Th2 es posible la aparición de fenómenos inmunopatológicos, fundamentalmente la formación de inmunocomplejos circulantes y en menor proporción la aparición de auto-anticuerpos (Brandonisio et al., 1989; Kontos y Koutinas, 1993).

La presencia de ANA en enfermedades infecciosas crónicas del perro no es exclusiva de la leishmaniosis. En nuestra área geográfica, la ehrlichiosis tiene una prevalencia significativa y no son raros los perros que sufren ambas enfermedades simultáneamente. Para evitar interferencias, se descartó la presencia de ehrlichiosis mediante serología, excluyendo a los animales seropositivos. En cualquier caso, Kelly et al. (1994) después de analizar 40 muestras de perros con ehrlichia, encontraron un título de ANA positivo de 1:80 solo en un perro. Parece pues poco probable que esta enfermedad haya podido interferir con nuestros resultados.

PREVALENCIA DE LOS ANA

Para definir la importancia de los ANA en la leishmaniosis canina hemos de conocer su prevalencia. Los trabajos publicados hasta ahora han determinado cifras variables y siempre utilizando técnicas de IFI sobre hígado de rata. Nuestro objetivo ha sido determinar la prevalencia de ANA en perros con leishmaniosis utilizando tanto esta técnica como la técnica de IFI sobre células Hep-2, y técnicas específicas de antígenos que en general se consideran más sensibles.

Inmunofluorescencia sobre hígado de rata

Empleando esta técnica, 14 de los 60 perros estudiados (23,3%) presentaron un título de ANA positivo. Estos resultados son similares a la prevalencia obtenida en trabajos previos empleando el mismo tipo de sustrato. En un estudio anterior llevado a cabo también en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de Córdoba, se aplicó la misma técnica sobre una muestra más reducida empleando criocortes de hígado de rata como sustrato. Se obtuvo una prevalencia de ANA del 15,9%. La muestra estudiada fue relativamente pequeña y en una enfermedad tan variable como la leishmaniosis canina, este hecho puede explicar las diferencias encontradas (Lucena et al., 1996). En un trabajo anterior, 14 de 45 perros con leishmaniosis (31%), presentaron un título positivo de ANA (Slappendel, 1988); mientras que en otro trabajo posterior 28 de 53 perros (52%) mostraron títulos positivos de ANA (Ciaramella et al., 1997).

Resumiendo los resultados anteriores, los ANA se encuentran elevados en un número significativo de perros con leishmaniosis, que podría oscilar en un amplio margen comprendido entre el 23% y el 52% de los perros enfermos. Todos estos trabajos han empleado como sustrato criocortes de hígado de rata. De entre todas las técnicas empleadas, la inmunofluorescencia indirecta usando el hígado de rata como sustrato ha sido el método tradicional (Fritzler, 1992) y

se considera un método útil para la determinación de ANA en el perro (Bell et al., 1997).

La elección del sustrato es uno de los factores técnicos más importantes en las pruebas de IFI (Fritzler, 1992). Los estudios comparando varios sustratos han demostrado que son comparables en su capacidad para cuantificar los títulos de anticuerpos (Fritzler, 1992). Sin embargo, algunas encuestas de calidad hechas para varios métodos de IFI en muchos laboratorios americanos, detectaron hasta diferencias del orden de 64x en los títulos de ANA en el mismo suero (McVey y Shuman, 1991). Los factores técnicos que limitan la reproducibilidad inter- e intraensayo son: sustrato, carencia de sueros patrón con un título definido para ANA de diferente especificidad, diferencias en la calidad y conformación de las ópticas de los microscopios, distintos conjugados y diferencias de concentración, especificidad y tasas de fluorocromo/proteína (Fritzler, 1992). Estos factores técnicos junto con diferencias poblacionales pueden explicar las variaciones registradas en la prevalencia de ANA.

Muchos de estos problemas pueden solucionarse empleando un título de positividad apropiado para reducir los falsos positivos. En laboratorios de humana se realiza una primera dilución al 1:40 para personas menores de 40 años y de 1:80 para personas mayores de esta edad. También es aconsejable verificar periódicamente la validez del título frente a una batería de sueros sanos, para asegurarnos que hay menos de 5-10% de positivos en esta población de referencia

(Astion et al., 2000). El título definido como positivo debe ser elegido de tal forma que entre el 5-7% de la población clínicamente sana sea positiva (Astion et al., 2000). En nuestro estudio, se utilizó un grupo de 30 perros sanos para comprobar la validez de nuestro título. Ninguno de estos animales obtuvo un título positivo, por lo que la probabilidad de obtener resultados falsos positivos parece muy pequeña, sin embargo es probable que hubiese algún resultado falso negativo. La alta prevalencia citada por Ciaramella et al. (1997) puede deberse a la existencia de resultados de este tipo. Desgraciadamente, estos autores no citan el título que consideran como positivo, siendo este dato la mayor fuente de variación entre laboratorios (Lapras y Monier, 1971). El mayor atractivo de las pruebas de fluorescencia para la titulación de ANA es su simplicidad y su sensibilidad. Sin embargo, se ha demostrado que si no se usan controles adecuados pueden existir grandes variaciones entre laboratorios. En un estudio donde se remitió una serie de sueros a diferentes laboratorios se comprobó que la correlación entre los resultados de la determinación de ANA en gatos no era significativa, mientras que en perros el coeficiente de correlación fue significativo pero con un valor de sólo 0,66 (Troy et al., 1996).

Inmunofluorescencia sobre células Hep-2

Empleando las células Hep-2 como sustrato sobre una población de 67 perros con leishmaniosis, el porcentaje de positividad se elevó al 55,23% y se obtuvieron unos títulos relativamente

elevados, alcanzando en 11 perros títulos iguales o superiores a 320 que podemos considerar como clínicamente muy significativos (Figura 7).

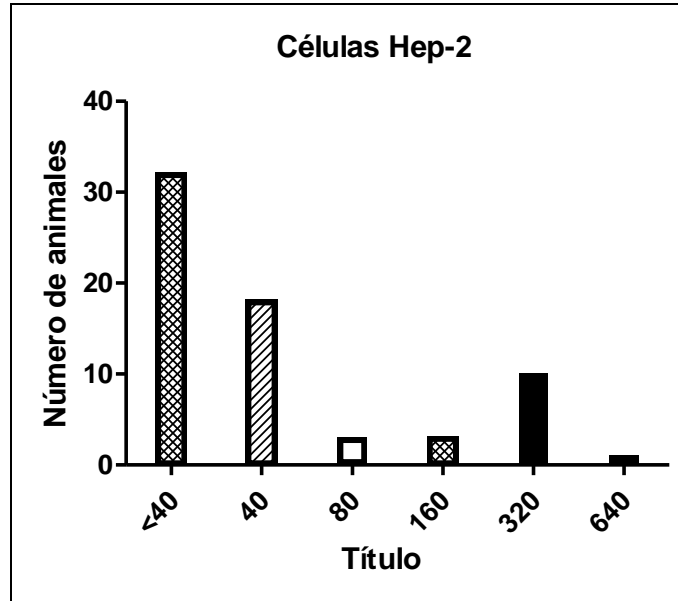


Figura 7.- Histograma de la distribución de títulos positivos en la prueba de IFI sobre células Hep-2.

Existe la opinión generalizada de que al menos deben emplearse dos sustratos diferentes antes de considerar una muestra como negativa (Fritzler, 1992). La elección más práctica son los cultivos celulares (por ejemplo células Hep-2), los cuales producen una proporción menor de resultados falsos negativos (Fritzler, 1992). Por otro lado, las células Hep-2 han demostrado ser un sustrato mucho

más fiable que los criocortes de hígado de rata para la investigación de ANA en el perro ya que también producen una menor proporción de falsos positivos (Hansson et al., 1996).

En el perro, trabajos previos han demostrado que las reacciones positivas con diluciones bajas eran relativamente frecuentes en perros sanos utilizando como substrato cortes de hígado de rata. Por el contrario, los perros sanos no mostraron reactividad alguna cuando se usaron células Hep-2 como substrato, incluso analizando las muestras a diluciones tan bajas como 1:15 (Hansson et al., 1996). Estos autores concluyeron que las células HEp-2 eran un substrato mucho más apropiado para el perro debido a su baja reactividad con los sueros de perros normales. Otra consideración importante es el alto nivel de correlación (62:63) que encontraron en perros enfermos para ambos substratos.

Un segundo motivo de controversia es decidir a partir de qué título consideramos significativa la presencia de ANA en el contexto de la enfermedad. La importancia de este punto es grande si tenemos en cuenta que títulos positivos de ANA se han identificado en muchas enfermedades tumorales, inflamatorias e infecciosas e incluso en personas sanas (McVey y Shuman, 1991). La determinación de ANA es por tanto una técnica inespecífica (Shull et al., 1983). Otras veces los ANA aparecen meses o años antes de que se desarrolle el cuadro clínico íntegro de la enfermedad autoinmune (Bradwell et al., 1995). La

incidencia de ANA puede aumentar con la edad del paciente (Svec y Veit, 1967). Aproximadamente entre el 30 y el 38% de personas mayores de 60 años tienen títulos significativos de ANA (Litwin y Singer, 1965; Wilson y Sanders, 1992). Parece ser que estas personas tendrían ANA de la clase IgM e IgA pero en ningún caso de la clase IgG (Svec y Veit, 1967). La prevalencia de ANA en perros sanos parece ser mayor en perros de la raza pastor alemán (Chabanne et al., 1995).

En nuestro trabajo se eligió un título de 1:40 como valor de corte. Este título es menor del recomendado por trabajos previos donde se han empleado títulos de corte de 1:100 (Hansson et al., 1996). Como en el apartado anterior, la técnica se aplicó sobre 30 animales sanos sin que hubiera ninguna muestra positiva aplicando un valor de corte de 1:40. Este es también el valor recomendado por el fabricante de los reactivos. A pesar de estas precauciones, más de la mitad de perros con leishmaniosis fueron positivos con el título más bajo, y es probable que alguno de estos resultados constituyan falsos positivos o bien que la leishmaniosis canina induzca títulos no demasiado elevados de ANA.

En conclusión, títulos bajos de anticuerpos antinucleares son relativamente frecuentes en la leishmaniosis canina aunque su prevalencia varía según la técnica empleada. Por su mayor sensibilidad y por permitir la diferenciación de varios patrones de

inmunofluorescencia, la técnica de IFI sobre células Hep-2 es la técnica de elección para la determinación de ANA en perros con leishmaniosis.

PATRONES DE INMUNOFLUORESCENCIA

Sólo tres tipos de patrones de inmunofluorescencia pudieron ser definidos claramente: nuclear homogéneo, nucleolar y citoplasmático. El patrón nuclear fue el patrón predominante al estar presente en 15 animales, otros 11 presentaron un patrón citoplasmático y finalmente en 6 animales el patrón fue nucleolar. En 3 ocasiones, las muestras presentaron un patrón mixto que siempre fue una combinación de patrón nuclear y citoplasmático.

Una de las mayores dificultades para la identificación de patrones mediante IFI es la reacción de fondo debido a la unión inespecífica de autoanticuerpos circulantes sin relevancia clínica (Astion et al., 2000). Los patrones de reacción más frecuentes del perro son por orden decreciente el nuclear homogéneo y el retículonodular. La fluorescencia periférica es rara (Chabanne et al., 1995). En un estudio sobre perros con hepatopatías crónicas, los patrones de inmunofluorescencia más frecuentes fueron el nuclear granular y también el nucleolar en mucha menor medida, indicando que los autoantígenos específicos pueden ser nRNP o ARN. Esto contrasta con el patrón nuclear homogéneo, característico de ANA anti

ADN e histonas que aparece en personas con hepatitis activa crónica (Andersson y Sevelius, 1992).

En otro trabajo sobre 111 perros ANA positivos, el 90% de ellos mostraron un patrón nuclear granular o atípico granular. El patrón nuclear homogéneo, nuclear periférico y nucleolar se presentaron en pocos casos (Kass et al., 1985).

La mayoría de los perros en nuestro trabajo presentaron sólo un tipo de patrón. Los patrones mixtos se producen cuando el suero de un paciente contiene más de un anticuerpo. En estos casos, diferentes diluciones pueden producir diferentes patrones de inmunofluorescencia en función de la concentración de cada uno de los ANA (Bradwell et al., 1995).

Excepto en los patrones nucleolares y de centrómero donde los antígenos están muy bien definidos, no es aconsejable confiar en el resto de patrones para determinar la especificidad de los ANA. Puesto que muchos ANA o combinaciones de ellos pueden producir patrones nucleares homogéneos o moteados (speckled), es conveniente analizar las muestras positivas que presenten estos patrones con una técnica específica al menos para dsDNA y ENA (Bradwell et al., 1995).

En personas con LES, el patrón nuclear homogéneo está correlacionado como anticuerpos anti-histonas y anti-dsDNA (Astion et

al., 2000), el patrón anular con anticuerpos anti-dsDNA y el moteado o punteado del núcleo se asocia con anticuerpos frente a antígenos extractables (Sm, SS-A, SS-B, RNP, Scl-70 y Jo-1) (Bell et al., 1997).

La interpretación de los patrones de inmunofluorescencia está mucho más avanzada en personas que en el perro. La mayoría de trabajos en el perro han intentado simplemente extrapolar la información obtenida en personas. En los perros con leishmaniosis, el patrón nuclear homogéneo fue el más frecuente. El patrón homogéneo nuclear se define como la presencia de fluorescencia uniforme difusa de todo el núcleo de las células en interfase. La intensidad de la fluorescencia es más pronunciada en la región cromosómica de las células en mitosis. El citoplasma circundante es negativo. Se asocia con ANA para dsDNA, histonas, (sobre todo H2A-H2B-DNA), Ku y otros antígenos abundantes asociados con cromatina (Bradwell et al., 1995; Astion et al., 2000).

En nuestro trabajo, la elevada prevalencia de anticuerpos anti-histonas encontrada en estos mismos animales podría explicar el predominio de este patrón (Figura 8).

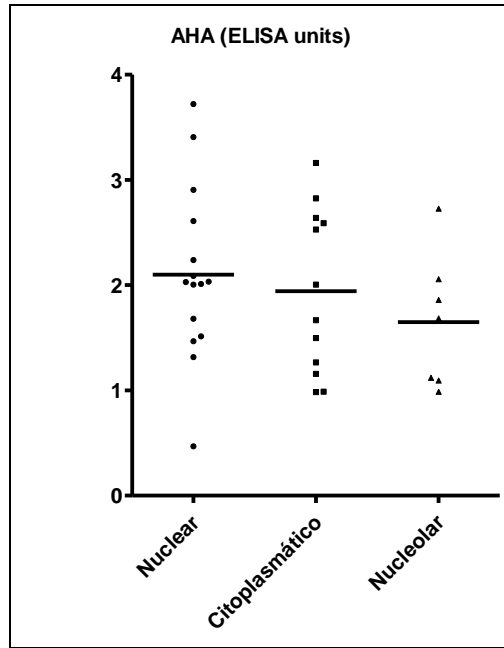


Figura 8.-Niveles de AHA agrupados según el patrón de inmunofluorescencia obtenido sobre células Hep-2. La barra horizontal representa la media.

El patrón nucleolar homogéneo fue el menos frecuente, sólo 7 perros presentaron este tipo de patrón. En personas, se sabe que la fluorescencia de todo el nucleolo es debida a anticuerpos para PM-Scl, ARN-polimerasas, fibrilarina y otros (Astion et al., 2000). Las células en metafase generalmente muestran una tinción difusa débil del nucleoplasma. No hay fluorescencia en la región cromosómica condensada. Clínicamente se asocia en el 50% de pacientes con el síndrome superpuesto de polimiositis-escleroderma y menos

frecuentemente con las enfermedades individuales. El antígeno PM-Scl o complejo nucleolar se compone al menos de 10 polipéptidos de los cuales los principales componentes antigénicos tienen un peso molecular de 75 kDa y 100 kDa. Un patrón nucleolar similar con tinción nuclear homogénea se produce con los anticuerpos Ku. El antígeno Ku consta de dos proteínas de 66 kDa y 86 kDa que se unen al ADN pero cuya función exacta es desconocida (Bradwell et al., 1995).

El patrón citoplasmático está producido por la presencia de autoanticuerpos frente a proteínas del citoplasma. No serían por tanto, estrictamente hablando, anticuerpos antinucleares. En personas es importante por su asociación con enfermedades reumáticas, pero no siempre las pruebas de IFI sobre células Hep-2 permiten identificar con su exactitud las diferentes estructuras del citoesqueleto y títulos bajos son normales en personas de mayor edad (Bradwell et al., 1995). Las proteínas citoplasmáticas se diferencian en 6 grupos principales, entre ellas la actina y la tubulina frente a las cuales se han descrito autoanticuerpos en perros con leishmaniosis (Pateraki et al., 1983). La identificación del patrón citoplasmático en una parte significativa de los perros analizados podría explicarse por la presencia de este tipo de autoanticuerpos. No obstante, al menos en nuestras manos, la técnica de IFI sobre células Hep-2 no permitió diferenciar entre los patrones citoplasmáticos antígeno-específicos que están descritos en personas (Bradwell et al., 1995). Normalmente la claridad con que se define un patrón depende del título de autoanticuerpos y de su afinidad. En

perros con leishmaniosis, el nivel de autoanticuerpos frente a proteínas citoplasmáticas como la actina, y la tubulina no sería lo suficientemente elevado como para producir patrones de inmunofluorescencia bien diferenciados.

Normalmente, los pacientes sin tinción nuclear pero que tienen una tinción identificable del citoplasma con una intensidad superior a la del control se consideran como ANA negativos. No obstante, esta observación se suele hacer constar en el informe pues se sabe que alguno de los patrones citoplasmáticos están asociados con ciertas enfermedades (Astion et al., 2000). Por ejemplo, en personas el patrón citoplasmático mitocondrial se ha asociado con cirrosis biliar primaria y el ribosomal con LES (Astion et al., 2000).

Ninguno de los tres patrones de inmunofluorescencia identificados sobre células Hep-2 estaba significativamente asociado con anticuerpos antinucleares específicos para histonas, ADN de doble cadena o anticuerpos para antígenos nucleares solubles (Fig. 8). No parece por tanto que, en perros con leishmaniosis, el patrón de inmunofluorescencia sea específico de un tipo de anticuerpos antinucleares concreto.

CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Un problema para determinar la prevalencia real de ANA en cualquier enfermedad, es la ausencia de buena correlación entre las pruebas de inmunofluorescencia que emplean diferentes sustratos. En un estudio sobre 69 sueros y considerando como positivos títulos \geq de 1:40, el porcentaje de positividad fue del 70% empleando células Hep-2 frente a un 29% empleando hígado de rata (Rommel et al., 1996). Por tanto, las células Hep-2 permiten una mayor sensibilidad en la detección de ANA. Sin embargo, en otro estudio anterior analizando 141 sueros de pacientes con enfermedades reumáticas, el porcentaje de positividad fue similar para ambos sustratos pero se encontró una tendencia a obtener títulos positivos más altos empleando las células Hep-2 como sustrato (Miller et al., 1985). Trabajos posteriores en perros sanos demostraron por el contrario que a diluciones bajas, la técnica de IFI sobre criocortes de rata producía una gran cantidad de resultados positivos (Hansson et al., 1966; Hansson, 1999). Existe por tanto controversia sobre la sensibilidad y especificidad de las pruebas de IFI.

En este trabajo, se estableció la correlación entre ambas pruebas a partir de 24 muestras que habían obtenido un título positivo en al menos una de las dos técnicas empleadas. Se dio prioridad al establecimiento de la correlación positiva dado que el número de

muestras que se pudieron procesar era limitado y porque la correlación negativa tiene un interés menor.

La correlación positiva se puede describir como reducida, pues se alcanzó sólo en el 29% de las muestras. Parte de esta baja correlación está seguramente relacionada con la menor sensibilidad de los cortes de hígado de rata, ya que un 45,8% de muestras (11 animales) alcanzaron un título positivo cuando se ensayaron sobre las células Hep-2 pero fueron negativas sobre los cortes de hígado de rata. No obstante, aunque las células Hep-2 son sin duda un substrato más sensible, también se produjo la situación contraria en 6 muestras (25%). Estas muestras fueron positivas sólo sobre las células de hígado de rata. La explicación a esta falta de correlación tan acusada debe estar relacionada con la mejor o peor expresión de antígenos nucleares en cada substrato. También puede estar relacionada con la mayor o menor especificidad de cada substrato, de tal modo que algunos de los resultados positivos fueran realmente falsos positivos. Si el título de corte elegido para la técnica de IFI sobre criocortes de rata hubiera sido poco específico, es posible que alguna de estas 6 muestras positivas únicamente en esta técnica, sean realmente falsos positivos. El uso de suero con diluciones bajas favorecería la unión inespecífica de las inmunoglobulinas sobre el material nuclear. Esta opción parece poco probable pues el título de 1:20 como positividad se estableció a partir de 30 perros sanos. Esta falta de correlación también ha sido descrita previamente. Puesto que la expresión de

ciertos antígenos nucleares manifiesta diferencias cualitativas y cuantitativas en los diferentes substratos, las pruebas de IFI para ANA pueden ser negativas en cortes de órganos y positivas en cultivos celulares o al contrario. En cualquier caso, los cultivos celulares proporcionan un substrato que contiene una mayor variedad de antígenos nucleares y es más aconsejable para reducir la proporción de falsos negativos (Fritzler, 1992).

Las células Hep-2 cada vez más están reemplazando a los tejidos de roedores debido a las numerosas ventajas que ofrecen, aumentando significativamente la sensibilidad de la técnica (Bradwell et al., 1995). La mayor sensibilidad de los cultivos celulares se debe a que sus núcleos son mayores, algunos antígenos están presentes en mayor concentración en estas células tumorales poco diferenciadas que en tejidos muy diferenciados como son el hígado o el riñón, su disposición monocelular asegura que todos los núcleos son visibles y no existe matriz de tejido conectivo que dificulte la observación de las células (Tan, 1982; Fritzler, 1992).

En un trabajo anterior, estudiando la correlación entre diferentes métodos para la determinación de ANA en el perro, se obtuvieron resultados sorprendentes por la falta de correlación, que podrían deberse al hecho de que ninguna de las muestras procedentes de perros con diversas enfermedades reumáticas alcanzó títulos positivos sobre las células Hep-2. Estos autores (Bell et al., 1997) compararon

las pruebas de IFI sobre cortes de hígado de rata y células Hep-2, con métodos ELISA para ADN de doble cadena, ADN de cadena simple y para histonas y con técnicas de western blotting usando homogeneizados de células de hígado de rata. No hubo correlación entre los títulos de ANA y los anticuerpos para los antígenos nucleares. El método de western blotting produjo un patrón demasiado complejo como para identificar los antígenos específicos. Los títulos de ANA y los valores obtenidos en el ELISA anti-histonas estaban sólo débilmente correlacionados ($r = 0,34$).

La conclusión del trabajo es que debe existir un amplio rango de reactividades o existe unión inespecífica de inmunoglobulinas sobre los cortes de hígado de rata. De hecho, usando las células Hep-2 como substrato, ninguna de las muestras analizadas tenía un título positivo (Bell et al., 1997). Fue sorprendente que el ELISA no demostrase la presencia de reacciones específicas antígeno-anticuerpo y esto hace dudar sobre la fiabilidad de las pruebas IFI. Empleando como substrato nuclear las células Hep-2, consideradas como el sistema más sensible para el diagnóstico de LES humano, ninguno de los sueros ANA-positivos sobre hígado de rata fueron positivos. El mismo resultado se obtuvo empleando como substrato el quinetoplasto de *Crithidia luciliae* (Bell et al., 1997).

En la figura 9 se puede apreciar la débil correlación entre los títulos obtenidos en la prueba de IFI sobre células Hep-2 y los niveles

de anticuerpos anti-histonas de los mismos perros. Hasta cierto punto resulta lógica la falta de correlación entre las pruebas de IFI y las pruebas de ELISA, ya que las muestras incluidas en este estudio podían contener ANA dirigidos frente a antígenos diferentes a los incluidos en el ELISA. Una gran variedad de ANA son detectados sobre hígado de rata pero existen dudas sobre la sensibilidad y especificidad del test en perros (Bell et al., 1997). Otros autores apuntan a que debido a su mayor objetividad y a la posibilidad de analizar un número elevado de muestras, las técnicas IFI deben ser reemplazadas por técnicas de enzimo-inmuno ensayo (Kumagai y Hayashi, 2001).

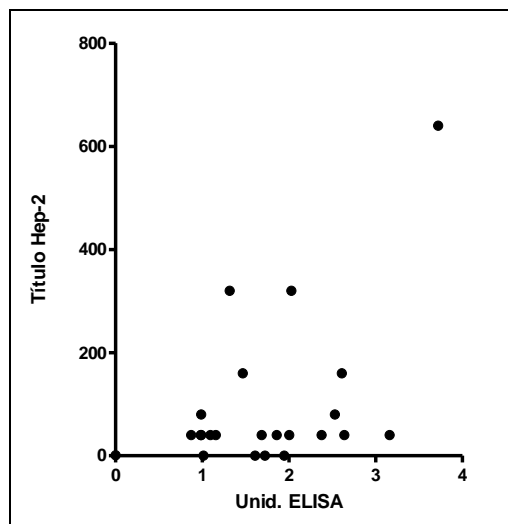


Figura 9.- Correlación entre títulos de ANA en IFI sobre células Hep-2 y anticuerpos antihistonas en unidades ELISA.

ISOTIPOS DE ANA

En 14 muestras con títulos positivos sobre cortes de hígado de rata, se introdujo un paso adicional en el método de IFI para determinar el isotipo de los ANA presentes. El isotipo más frecuente fue el IgM aunque a títulos nunca superiores a 1:150 y, salvo en 3 casos, siempre acompañado por ANA del isotipo IgG y en menos casos IgA. Los títulos más elevados fueron los del isotipo IgG.

En un estudio amplio en personas con LES, los ANA IgG se detectaron en el 96% de pacientes, IgM en el 81% e IgA en el 51%. La mayoría de pacientes tenía más de un isotipo de ANA. El 50% tenía ANA de los 3 isotipos, el 27% IgG e IgM, el 1% IgG e IgA y el 18% sólo IgG y el 4% sólo IgM (González y Rothfield, 1966). No se encontró correlación entre la duración de la enfermedad y la clase de inmunoglobulina en los ANA. La presencia de ANA de la clase IgA fue mayor entre pacientes con enfermedad clínicamente activa comparada con pacientes en remisión (González y Rothfield, 1966).

En un estudio en perros con LES, sólo los ANA de tipo IgG estaban elevados en comparación con los perros normales (Monestier et al., 1995). Además, estos ANA de la clase IgG parecen estar restringidos a ciertas subclases, especialmente las subclases IgG1 e IgG3, que son las que mayor capacidad tienen para fijar el Complemento (Schur et al., 1972).

El isotipo de ANA está directamente relacionado con su potencial patogénico. Los isotipos IgM predominan en la respuesta primaria, por lo general alcanzan títulos bajos, tiene una afinidad reducida y su vida media es corta. Por su parte, los isotipos IgG predominan en la respuesta inmune secundaria y son los de mayor potencial patogénico. La producción de anticuerpos IgG anti-ADN requiere la interacción entre las células B que producen los anticuerpos y las células T *helper* que activan la síntesis y secreción de anticuerpos por las células B. Para que se produzcan, las células que normalmente suprimen la activación de las células B, los linfocitos T CD8+ y las células *natural killer*, deben tener una actividad supresora deficiente. La hiperactividad de las células T *helper* está bien ilustrada en ratones y personas con LES, en el cual, péptidos procesados desde autoanticuerpos para ADN activan las células T *helper*, un proceso que a su vez aumenta la síntesis de anticuerpos patogénicos para el ADN (Hahn, 1998). En un modelo experimental de perros con LES, la actividad de los linfocitos T supresores era menor en los perros con LES que en perros sanos de la misma colonia (Monier et al., 1988).

Otro factor importante para explicar la aparición de ANA de un isotipo concreto es la capacidad de eliminación de los CIC donde se encuentran incluidos los ANA. Se sabe que el aclaramiento de los inmunocomplejos por las células fagocíticas es también deficiente en pacientes con LES. Esto se debe en parte a un número reducido de receptores para la fracción CR1 del Complemento sobre la superficie

celular. La eliminación defectuosa también puede deberse a una fagocitosis inadecuada de inmunocomplejos IgG2 e IgG3. La red idiotípica que previene la sobreproducción de anticuerpos en sujetos normales es probablemente defectuosa en pacientes con LES (Hahn, 1998).

El predominio de ANA IgM parece restar importancia patogénica a los ANA en la leishmaniosis canina. En la mayoría de procesos autoinmunes humanos (Massa et al., 1995) y caninos (Kass et al., 1985), predominan los ANA del isotipo IgG. Avila y Rojas (1990) encontraron una mayor frecuencia de auto-anticuerpos IgM en personas con leishmaniosis visceral, mientras que en la leishmaniosis cutánea localizada era más frecuente la asociación IgM-IgG, tal y como en los perros incluidos en nuestro estudio. Este hecho puede ser un reflejo de la mayor prevalencia de lesiones cutáneas en la leishmaniosis canina.

No pudo encontrarse una relación clara entre el isotipo de inmunoglobulina presente en los ANA y los síntomas clínicos, probablemente por el reducido tamaño de la muestra y por la participación de otros factores patogénicos en el desarrollo de los síntomas. De forma similar, Nieto et al. (1992) tampoco pudieron establecer una correlación significativa entre el isotipo de los CIC y las lesiones glomerulares en perros con leishmaniosis. En conclusión,

aunque el isotipo IgM fue el predominante en los ANA, la mayoría de perros mostraron una combinación de isotipos IgM e IgG o IgA.

ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA

La especificidad antigénica puede guardar relación con el origen y mecanismo de producción de cada tipo de ANA. Por ejemplo, la exposición prolongada de los queratinocitos a luz UV produce apoptosis y, durante la misma, partículas del núcleo se empaquetan en vesículas de la membrana celular. Algunas de estas vesículas contienen complejos de ARN y proteínas como el antígeno Ro (SS-A). Los anticuerpos frente a estas proteínas se asocian con erupciones cutáneas en pacientes con lupus cutáneo subagudo y en neonatos con lupus (Hahn, 1998).

Para determinar la especificidad antigénica de los ANA, en primer lugar habría que identificar las muestras positivas mediante inmunofluorescencia indirecta (Gelberg et al., 1985). En el perro, esta prueba tiene por sí sola valor diagnóstico para detectar mecanismos autoinmunes comparables a los que se presentan en el hombre (Lapras y Monier, 1971). Detecta la gran mayoría de los ANA ya que la mayor parte de los antígenos nucleares se encuentran presentes en los tejidos que utiliza (Bentwich et al., 1988; Nakamura y Robbins, 1992). Una vez obtenidos resultados positivos, se determinaría la especificidad de los ANA mediante otras técnicas (inmunodifusión,

hemaglutinación pasiva, contraelectroforesis, RIA y ELISA) (Bentwich et al., 1988).

Actualmente, dos técnicas permiten la identificación de la especificidad antigénica de los ANA: el ELISA y la contra-inmunolectroforesis (CIE). Henriksson et al. (1998) intentaron caracterizar la especificidad antigénica de una serie de sueros caninos ANA positivos mediante inmunodifusión. Los sueros positivos y negativos empleados fueron sueros de referencia humanos. Mediante estos sueros se identificaron las líneas de precipitación de los antígenos RNP A y C, el antígeno principal RNP (U1-70K) y el Sm se identificaron mediante anticuerpos monoclonales. Los antígenos se obtuvieron a partir de homogeneizados de células Hep-2. Los resultados indicaron que no había una relación clara entre el patrón de inmunofluorescencia y ciertas especificidades aunque si había correlación entre la positividad mediante inmunofluorescencia e inmunodifusión. Las conclusiones de este trabajo fueron que, aunque el patrón anti-histonas difiere dramáticamente entre personas y perros, tanto el reconocimiento de varias proteínas antigénicas asociadas a RNP como el reconocimiento de dominios dentro de la proteína U1-70K es similar en ambas especies. Por tanto, la respuesta de auto-anticuerpos contra las proteínas Sm y RNP existe también en el perro.

En los sueros positivos de perros con leishmaniosis investigamos la presencia de ANA específicos para varios auto-antígenos.

ADN de doble cadena

La carga catiónica de los anticuerpos anti-ADN les proporciona gran poder patógeno, posiblemente porque los anticuerpos se unen a moléculas de la membrana basal del glomérulo cargadas negativamente (Hahn, 1998). Otro factor de patogenicidad determinante puede ser la capacidad de los ANA para ADN de unirse a antígenos adicionales de la membrana basal, tales como el C1q o nucleosomas unidos al colágeno tipo IV o a componentes tisulares de los glomérulos o de las paredes de los vasos, tales como laminina o el heparán sulfato (Hahn, 1998).

Inicialmente se pensaba que los ANA no podían penetrar en el interior de células vivas. Después se comprobó que los anticuerpos frente a ribonucleoproteínas podían penetrar en el interior de células mononucleares humanas vivas mediante su unión con los receptores Fc (Alarcón-Segovia et al., 1978). Se piensa que los anticuerpos anti-ADN del LES penetran al interior de las células a través de la miosina presente en la membrana celular (Hahn, 1998).

Aparte de un amplio espectro y mayor potencial patogénico, la determinación de ANA específicos para ADN de doble cadena también puede ser interesante por la relación que existe entre sus niveles y el grado de actividad clínica del LES en personas. En general, cuando los

tests para anticuerpos anti ADN de doble cadena se realizan a intervalos regulares, con independencia de los síntomas, se observa que cuando los títulos aumentan, la posibilidad de exacerbación de la enfermedad se multiplica por dos o tres en los siguientes 3-4 meses. Si se detecta una elevación brusca, la exacerbación suele ser inmediata y manifestada por glomerulonefritis o vasculitis en pocas semanas. En algunos pacientes, el título de ANA para ADN de doble cadena es una medición excelente para controlar el grado de actividad de la enfermedad. En otros pacientes, el aumento de actividad se controla mejor detectando la caída de las concentraciones plasmáticas del Complemento (Hahn, 1998). Aparte del LES, muchos ANA no fluctúan en función de la actividad de la enfermedad y por eso su cuantificación precisa no es necesaria (Bradwell et al., 1995).

Para estudiar la presencia de ANA específicos para ADN de doble cadena, se analizaron las muestras de 34 perros con leishmaniosis y títulos positivos sobre células Hep-2 y/o cortes de hígado de rata. La determinación se hizo mediante inmunofluorescencia sobre cultivos del protozoo *Crithidia luciliae*. Este protozoo se ha demostrado como un substrato útil para detectar anticuerpos específicos para ADN nativo. Posee una gran mitocondria que contiene ADN relativamente libre de otros antígenos nucleares como las histonas (Halliwell, 1982; Fritzler, 1992). Además de su sencillez, la técnica presenta la ventaja de que, a diferencia de otros ensayos IFI que detectan sólo anticuerpos de alta afinidad, este

método detecta tanto anticuerpos de alta como de baja afinidad (Bentwich et al., 1988).

De las 34 muestras sólo una de ellas alcanzó un título positivo de 1:80. De estos resultados se desprende que en perros con leishmaniosis el desarrollo de ANA específicos para ADN de doble cadena es excepcional. Otra consideración sería cuestionar la validez de la prueba. En el perro, algunos autores consideran que la técnica de *Crithidia luciliae* carece de sensibilidad suficiente para ser empleada como técnica de rutina, además parece detectar preferentemente anticuerpos para ADN de doble cadena de baja afinidad y recomiendan el empleo de métodos ELISA que son positivos en el 90% de perros con LES (Halliwell, 1982; Jones, 1993). También se ha apuntado la posibilidad de que en el suero canino existan ciertos componentes no específicos que se unen al ADN e interfieren con la unión de los anticuerpos anti-ADN (Andersson y Sevelius, 1992). Cualquiera que sea la explicación, la falta casi absoluta de positividad en muestras positivas por otras técnicas de IFI indica que esta técnica no es útil para detectar ANA en perros con leishmaniosis y seguramente en otras enfermedades.

Monier et al. (1988) emplearon este ensayo para detección de ADN de doble cadena en perros con LES partiendo de una dilución inicial de 1:2, mientras que el método empleado aconseja diluir las muestras al 1:10. Es posible que hubiese un mayor número de positivos si hubiésemos llevado a cabo el ensayo con una dilución

menor. En cualquier caso, es difícil valorar el significado clínico de títulos tan bajos.

El papel que el auto-antígeno específico juega dirigiendo la producción de auto-anticuerpos en las enfermedades sistémicas autoinmunes no está bien determinado. En primer lugar, los auto-anticuerpos para ADN, los factores reumatoides y otros auto-anticuerpos tienen un espectro de reactividad muy amplio. Por ejemplo, los ANA anti-ADN pueden unirse a varias combinaciones de ADN de doble cadena, ADN de cadena simple, polinucleótidos sintéticos, fosfolípidos, proteínas del citoesqueleto, polisacáridos, plaquetas, células Raji y linfocitos. Es probable que estos anticuerpos multiespecíficos reaccionen contra antígenos microbianos y sólo accidentalmente lo hagan con ADN y otros antígenos nucleares (Prud'homme y Parfrey, 1988).

Los estudios empleando anticuerpos monoclonales han demostrado que los anticuerpos que se unen exclusivamente a ADN de doble cadena son raros, y que la mayoría de ANA para ADN de doble cadena también reaccionan frente a ADN de cadena simple (Hahn, 1998). En conclusión, nuestros resultados parecen corroborar todas estas aseveraciones que restan gran valor a la determinación específica de este tipo de ANA.

Anticuerpos frente a ENA

Los ENA son antígenos nucleares solubles compuestos por pequeñas ribonucleoproteínas y otros antígenos celulares. Dentro de este grupo de antígenos se incluyen los antígenos Sm y nRNP. El mayor interés de identificar la especificidad de los ANA es su asociación con ciertas enfermedades. Un ejemplo claro son los ANA anti-Sm que en personas aparecen exclusivamente en el LES y tienen por tanto un valor diagnóstico elevado (Wilson y Sanders, 1992). Por su parte, el antígeno nRNP está constituido por un grupo de ribonucleoproteínas nucleares que en personas se asocia a varias enfermedades reumáticas.

Nuestro objetivo era investigar la presencia de ANA específicos de estos antígenos en perros con leishmaniosis pero en ninguna de las 34 muestras analizadas de perros con leishmaniosis se detectó la presencia de anticuerpos frente a ENA.

En un amplio estudio sobre 580 perros que mostraban al menos 1 síntoma de LES, 132 fueron positivos para ANA. De estos perros ANA-seropositivo, 8 tenían anticuerpos para ADN de doble cadena, 35 de 66 sueros investigados eran positivos para histonas, en 9 perros se encontraron ANA para el antígeno Sm y en otros 9 anticuerpos frente a RNP. Cuando se investigó la presencia de anticuerpos para el antígeno Ro (también llamado SS-A), sólo 1 de los 580 perros fue

positivo (White et al., 1992). Según los resultados de este estudio, la prevalencia de ANA anti-ENA sería muy baja en el perro.

Aparte de la teórica baja prevalencia de ANA específicos de los ENA en el perro, otro motivo para explicar la ausencia de resultados positivos podría ser la técnica elegida. Para algunos autores, la inmunodifusión se considera una técnica insuficiente para determinar la especificidad de los ANA en el perro, debido fundamentalmente a que no todos los ANA tienen capacidad precipitante (Hansson y Karlsson-Parra, 1999). Estos autores encontraron que mediante la técnica de inmunodifusión de Ouchterlony, sólo los ANA asociados estrictamente con un patrón nuclear moteado producían líneas de precipitación. El resto de patrones de IFI no mostró actividad precipitante.

La mayoría de auto-antígenos caninos no se han identificado aún y es importante hacerlo y tener sueros de referencia. Además, los extractos proteicos desarrollados para la detección serológica de auto-anticuerpos humanos pueden ser deficientes cuando se aplican al perro. Un antígeno canino muy importante de 43kDa no está presente en algunos extractos comerciales. Las técnicas de immunoblotting y ELISA son más recomendables por dar más resolución a los auto-antígenos caninos (Henriksson et al., 1998). En nuestro caso, el kit empleado estaba desarrollado específicamente para el perro y los controles positivos producían líneas de precipitación fácilmente

identificables. Elegimos esta técnica por su simplicidad y porque se había usado con anterioridad de forma exitosa para la detección de anticuerpos específicos de antígenos nucleares solubles como el Sm en perros con LES (Costa et al., 1984). En conclusión, este tipo de ANA estaría ausente en perros con leishmaniosis o la técnica de inmunodifusión carece de la sensibilidad suficiente para detectarlos.

Histonas

Del total de muestras de perros con leishmaniosis analizadas (N = 93), 43 muestras (46,23%) presentaron una concentración de anticuerpos IgG anti-histonas elevada. Un tercio aproximadamente (32,5%) de las reacciones positivas se clasificaron como positivos débiles (N = 14); en 19 perros (44,18%) las reacciones se consideraron moderadas y 10 perros (23,2%) presentaron concentraciones consideradas como altas según la escala establecida.

Nuestros resultados muestran que los anticuerpos anti-histonas están elevados en un número significativo de perros con leishmaniosis. Los perros que mostraron reacciones clasificadas como débiles pueden considerarse como clínicamente no relevantes debido a la presencia de bajos títulos de ANA en muchas enfermedades. Sin embargo, la identificación de un 44,18% de perros con títulos clasificados como moderados pero en el rango de los encontrados en el LES canino y de un 23,2% con títulos altos, indican que los

anticuerpos anti-histonas pueden ser un factor patogénico importante responsable de las manifestaciones pleomórficas que caracterizan a la leishmaniosis canina.

El potencial patogénico de los ANA es muy variable pero se considera alto en el caso de los anticuerpos anti-histonas. Las histonas catiónicas pueden unirse a la membrana basal del glomérulo que está cargada negativamente, quedar fijadas y unirse con los anticuerpos anti-histonas formando complejos inmunes que darían lugar al desarrollo de una glomerulonefritis. Este mecanismo se ha propuesto para explicar la elevada incidencia de lesiones renales en el LES canino (Monestier et al., 1995), y podría contribuir al desarrollo de la glomerulonefritis característica de la leishmaniosis canina. En perros con LES se han encontrado anticuerpos IgG frente a histonas H1, H2A, H3 y H4 en concentraciones significativamente mayores que en perros sanos (Monestier et al., 1995).

En otro trabajo usando antígenos nucleares específicos (Bell et al., 1997), se identificaron en perros los anticuerpos anti-histonas y con un rango amplio de valores, coincidiendo con las observaciones de Monier et al. (1992). En este trabajo, los ANA para ADN de doble cadena estaban significativamente elevados en perros con artritis reumatoide. La mayoría de los escasos sueros positivos con ANA anti-ADN de doble cadena también tenían elevados niveles de ANA anti-

ADN de cadena simple. Esto puede indicar una activación policlonal de células B (Bell et al., 1997).

Varios de los mecanismos propuestos para explicar la formación de anticuerpos frente a componentes del ADN como las histonas, podrían tener lugar en la leishmaniosis canina: (1) pueden ser auto-anticuerpos naturales, parte del repertorio normal de anticuerpos auto-reactivos de baja afinidad; (2) la activación policlonal de células B clásicamente descrita en la infección por leishmania en perros con una respuesta inmune humoral; (3) estimulación antigénica específica por parte de antígenos del parásito (fosfolípidos, ADN, complejos ADN-proteínas) que podrían dar reacciones cruzadas con auto-antígenos nucleares. En todas estas hipótesis, la capacidad para formar anticuerpos anti-histonas dependería fuertemente de la susceptibilidad genética de cada animal. Esto explicaría que sólo estuvieran presentes en concentraciones clínicamente significativas en un porcentaje reducido de los perros que desarrollan la enfermedad.

CORRELACIÓN ENTRE ANTICUERPOS ANTI-HISTONAS Y GLOMERULONEFRITIS

En los perros con leishmaniosis, la prevalencia de títulos positivos de anticuerpos anti-histonas y sus niveles expresados en unidades ELISA fue significativamente mayor en el grupo de perros con glomerulonefritis. Según nuestros resultados, 7 de 18 perros

(38,8%) en el grupo I y 22 de 25 perros en el grupo II (88%) tenían títulos de anticuerpos anti-histonas en niveles similares al LES canino (Henriksson et al., 1998), indicando que la infección por leishmania puede inducir un incremento patogénicamente relevante en la formación de este tipo específico de ANA. Según nuestros resultados, los perros con leishmaniosis y una concentración aumentada de anticuerpos anti-histonas tendrían un riesgo mayor de desarrollar una glomerulonefritis inmunomediada.

En el grupo de perros con leishmaniosis estudiado, se encontró una correlación positiva significativa entre los niveles de anticuerpos anti-histonas y el cociente de UPC. Esta correlación dejaba de ser significativa cuando ambos grupos se analizaban de forma independiente. Esta aparente discrepancia podría estar relacionada con el tamaño muestral. Estadísticamente, al estudiar ambos grupos por separado se reduce el tamaño de la muestra, y también la probabilidad de que la prueba discrimine entre el efecto del azar y la existencia de relación entre ambas variables. También es razonable esperar un periodo variable de tiempo entre la formación de anticuerpos anti-histonas y la manifestación clínica de la glomerulonefritis, afectando negativamente a la posibilidad de detectar estadísticamente una correlación significativa entre ambas variables. Esta hipótesis estaría apoyada por la presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-histonas en perros del grupo I, que no mostraban signos de insuficiencia renal. Finalmente, dado el carácter crónico y

pleomórfico de la leishmaniosis canina, otros mecanismos, incluso sin relación alguna con la infección, pueden contribuir al desarrollo de patología glomerular o interferir con la correlación directa entre los niveles de anticuerpos anti-histonas y el cociente UPC.

Se ha demostrado que la proteinuria presente en perros con leishmaniosis está asociada con el daño glomerular y tubular que sufren estos animales y que una fracción significativa de la misma está producida por la excreción de IgG e IgA (Zaragoza et al., 2003). La proteinuria fue más intensa en los perros que presentaban el mayor número de síntomas, un resultado que coincide con lo observado en nuestro estudio.

Las lesiones glomerulares de la leishmaniosis canina también están correlacionadas con la presencia de antígenos del parásito en orina e incluso de amastigotes viables. La antigenuria se produce por la liberación de antígenos solubles del parásito. La presencia de ADN del parásito en la orina de perros infectados se ha estimado en un 25% pero no se ha podido establecer una correlación significativa entre la insuficiencia renal y la eliminación de ADN parasitario en orina, lo cual se interpreta como una falta de relación entre ambos fenómenos (Franceschi et al., 2007). Por el contrario, otros trabajos previos encontraron una correlación entre las lesiones renales y la presencia de ADN de *Leishmania* en orina (Manna et al., 2005; Solano-Gallego et al., 2005).

Las lesiones glomerulares encontradas en la leishmaniosis canina son lesiones típicamente asociadas con procesos patológicos inmunomediados (Poli et al., 1991; Zatelli et al., 2003), causados por el depósito de CIC que inician el daño renal (Franceschi et al., 2007). Todavía no se ha descrito minuciosamente el mecanismo de unión de la IgG y los CIC a la membrana basal del glomérulo para iniciar el proceso inflamatorio. Los inmunocomplejos no se unen a la membrana basal glomerular a menos que sean de naturaleza catiónica. A diferencia de los CIC anti-ADN de carácter aniónico, las histonas son catiónicas y se unen fácilmente a la membrana basal del glomérulo que presenta una carga negativa. Una vez ancladas sobre la membrana, actúan como antígenos fijando a sus anticuerpos específicos (Teodorescu et al., 2004). Mediante este mecanismo, aunque el poder patogénico de los ANA es variable, los ANA anti-histonas tendrían mayor capacidad para iniciar un proceso de glomerulonefritis. De hecho, las histonas y sus anticuerpos específicos pueden eluirse de los depósitos de CIC presentes en ratones con LES (Grotscholten et al., 2003). También, en perros con LES, fueron anticuerpos anti-histonas de la clase IgG los únicos encontrados en concentraciones significativamente mayores que en perros normales (Monestier et al., 1995). Nuestra hipótesis fue que este mecanismo podría también contribuir al desarrollo de glomerulonefritis en la leishmaniosis canina. El hallazgo de diferencias estadísticamente muy significativas en la prevalencia de títulos positivos de anticuerpos anti-

histonas y en las concentraciones séricas de estos ANA entre ambos grupos de perros con leishmaniosis y la correlación significativa entre los niveles séricos de anticuerpos anti-histonas y el cociente UPC indicarían que existe una asociación patogénica. También, considerando que el valor predictivo positivo de un título elevado de ANA anti-histonas para el desarrollo de glomerulonefritis fue del 88%, la determinación de este tipo de ANA podría tener interés clínico para valorar el riesgo de desarrollar lesiones glomerulares en perros con leishmaniosis.

Esta relación entre los anticuerpos anti-histonas y la patogenia de la enfermedad ha sido sugerida por trabajos previos donde se estudiaron anticuerpos dirigidos frente a las histonas H2A y H3 del parásito (Nieto et al., 1999). En principio no existe reacción cruzada entre estas histonas y las del perro pero es significativo que, en perros infectados experimentalmente, sólo aquellos donde los anticuerpos anti-histonas del parásito se elevaron mostraron signos clínicos de la enfermedad.

El grupo de perros sanos se empleó como referencia para identificar un aumento en los niveles de ANA anti-histonas, al no existir ningún suero de referencia con una concentración definida. El límite superior del rango normal se estableció como la media + 2 veces la DE de las lecturas de DO obtenidas en el grupo control. Este sistema para calcular la concentración de ANA anti-histonas en unidades ELISA y la escala empleada en esta tesis se han usado previamente en la

investigación de los ANA anti-histonas en personas y perros (Costa et al., 1984; Henriksson et al., 1998; Teodorescu et al., 2004). También es importante comentar que mediante estudios de pre-absorción sobre sueros con títulos positivos de ANA anti-histonas de perros con LES, se ha demostrado que las histonas bovinas empleadas en nuestro método ELISA reaccionan específicamente con los ANA anti-histonas de la clase IgG (Paul et al., 2005). La misma fuente de histonas se ha usado en otros trabajos previos (Costa et al., 1984; Monestier et al., 1995; Henriksson et al., 1998; Paul et al., 2005), lo que es importante para demostrar la especificidad de nuestro método ELISA.

Respecto a los niveles de creatinina séricos, no hubo correlación significativa entre las concentraciones de anticuerpos anti-histonas expresadas en unidades ELISA y las concentraciones de creatinina. Esta falta de correlación no es sorprendente pues se sabe que hay otros mecanismos implicados en la patogenia de las lesiones glomerulares de la leishmaniosis canina. Además, aunque la concentración sérica de creatinina varía inversamente con la tasa de filtración glomerular, su elevación no es específica de glomerulonefritis (DiBartola, 2000). Una situación similar existe en perros con LES donde se ha demostrado que las lesiones de nefritis pueden aparecer en ausencia de anticuerpos anti-ADN (Monestier et al., 1995). También, es razonable esperar que exista un periodo variable de tiempo entre la formación de los anticuerpos anti-histonas y las manifestaciones clínicas de enfermedad renal, un hecho que podría

ser valorado únicamente a través de estudios prospectivos usando perros infectados experimentalmente. Finalmente, se ha demostrado que los niveles de creatinina no son un indicador precoz de las lesiones glomerulares asociadas a la leishmaniosis canina (Palacio et al., 1997) y que no están correlacionados con el cociente UPC ni con la presión sanguínea en perros con insuficiencia renal (Buranakarl et al., 2007). Según los resultados de estos autores, hubiera sido más interesante correlacionar los anticuerpos anti-histonas con la enzimuria como índice más sensible y precoz para la detección de lesiones glomerulares en perros con leishmaniosis.

Además del LES, los anticuerpos anti-histonas se han detectado en personas con artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, neoplasias ANA positivas, cirrosis biliar primaria, escleroderma, enfermedades reumáticas y en pacientes geriátricos (Hahn, 1998). En nuestro estudio, se tomaron todas las precauciones posibles para mejorar la especificidad de nuestros resultados; una evaluación clínica y laboratorial completa, serología para otras enfermedades infecciosas y exclusión de perros de edad avanzada y de aquellos con síntomas poco frecuentes o atípicos de leishmaniosis canina.

La ehrlichiosis es la segunda enfermedad crónica más frecuente en nuestra región y un título serológico negativo no siempre permite descartarla. Además, en un trabajo previo (Nelly et al., 1994), se demostró que había una baja prevalencia de ANA en perros infectados

con *E. canis*. También se ha demostrado que el cociente UPC aumenta de forma marcada pero transitoria durante la fase aguda de la infección por *E. canis* (Codner y Maslin, 1992), por lo que consideramos poco probable que una ehrlichiosis concomitante pueda haber influido sobre nuestros resultados. Otros procesos capaces de interferir y que pudiesen no haber sido detectados se presentan de forma excepcional y dudamos por tanto que hayan podido inducir un sesgo en nuestros resultados.

La barrera de filtración glomerular se compone de células endoteliales capilares, una membrana basal cargada negativamente y los podocitos. La pérdida de la permeabilidad selectiva normal se puede identificar por la presencia de proteinuria y el cociente urinario de proteínas-creatinina permite la evaluación de enfermedades glomerulares primarias como la glomerulonefritis (DiBartola, 2000). Las lesiones glomerulares típicas en perros con leishmaniosis cursan con la aparición de proteinuria que es independiente del tipo histológico de lesión glomerular (Zatelli et al., 2003). Además, los resultados del cociente UPC canino no están afectados por diferencias en sexo, método de recolección de la orina o de si el animal se encuentra o no en ayunas en el momento de tomar la muestra o de la hora del día. Esto hace que el cociente UPC sea un método práctico y exacto de valorar la función glomerular en los perros con leishmaniosis que acuden a la consulta. La existencia de piuria o la contaminación con sangre de las muestras puede alterar el cociente de UPC en ausencia

de lesión glomerular (DiBartola, 2000). Todos los perros incluidos en este estudio presentaban un sedimento urinario normal y es por tanto poco probable que una inflamación urinaria hubiera pasado inadvertida incrementando el cociente de UPC. Además, se ha demostrado que muchos perros con piuria no tienen proteinuria y que la hematuria no causa un incremento en la proteinuria salvo que sea macroscópica (Vaden et al., 2004). En cualquier caso, el valor de corte para el diagnóstico de glomerulonefritis fue un UPC > 1 y no el habitualmente usado de > 0,5. De esta forma, un valor de corte más elevado permite aumentar su especificidad en el diagnóstico de glomerulonefritis reduciendo la posibilidad de resultados falsos positivos.

En conclusión, el hallazgo de una media de ANA anti-histonas significativamente superior en perros con glomerulonefritis asociada a leishmaniosis y la correlación entre los niveles de anticuerpos anti-histonas y el cociente de UPC en perros con leishmaniosis, muestran que existe una relación patogénica relevante entre la presencia de anticuerpos anti-histonas y las lesiones glomerulares en perros con leishmaniosis. Aunque otros factores deben estar forzosamente implicados, la determinación de ANA anti-histonas puede tener cierto interés clínico para valorar el riesgo de desarrollar glomerulonefritis inmunomediada en perros con leishmaniosis.

CONCLUSIONES

1.- Títulos bajos de anticuerpos antinucleares son relativamente frecuentes en la leishmaniosis canina aunque su prevalencia varía según la técnica empleada. Por su mayor sensibilidad y por permitir la diferenciación de varios patrones de inmunofluorescencia, la técnica de IFI sobre células Hep-2 es la técnica de elección para la determinación de ANA en perros con leishmaniosis.

2.- Ninguno de los tres patrones de inmunofluorescencia identificados sobre células Hep-2 estaba claramente asociado con anticuerpos antinucleares específicos para histonas, ADN de doble cadena o anticuerpos para antígenos nucleares solubles. No parece por tanto que, en perros con leishmaniosis, el patrón de inmunofluorescencia sea específico de un tipo de anticuerpos antinucleares concreto.

3.- Aunque el isotipo IgM fue el predominante en los anticuerpos antinucleares, la mayoría de perros mostraron una combinación de isotipos IgM e IgG o IgA. No pudo encontrarse una relación clara entre el isotipo de inmunoglobulina presente en los anticuerpos antinucleares y los síntomas clínicos, probablemente por la participación de otros factores patogénicos en el desarrollo de los síntomas de leishmaniosis.

4.- Los ANA específicos para ADN de doble cadena o para ENA están ausentes en perros con leishmaniosis o en una concentración

demasiado baja para ser detectada mediante IFI o doble inmunodifusión, respectivamente.

5.- En una proporción significativa de perros con leishmaniosis, los anticuerpos antinucleares anti-histonas alcanzan niveles similares a los encontrados en el LES canino. Pueden ser por tanto uno de los tipos de anticuerpos antinucleares de mayor importancia patogénica.

6.- En los perros con leishmaniosis, la prevalencia de títulos positivos de anticuerpos anti-histonas fue significativamente mayor en el grupo de perros con glomerulonefritis, indicando que la infección por leishmania puede inducir un incremento patogénicamente relevante en la formación de este tipo específico de anticuerpos antinucleares. En base al valor predictivo encontrado, los perros con leishmaniosis y una concentración aumentada de anticuerpos anti-histonas presentan un riesgo mayor de glomerulonefritis inmunomediada.

7.- En general, por sus títulos bajos, falta de especificidad y de asociación con síntomas clínicos concretos, los anticuerpos antinucleares constituyen un epifenómeno asociado a la leishmaniosis canina, cuya relevancia clínica parece limitada salvo en el caso de los anticuerpos anti histonas. La determinación de anticuerpos antinucleares anti-histonas puede tener interés clínico para valorar el riesgo de desarrollar glomerulonefritis inmunomediada en perros con leishmaniosis.

RESUMEN

La leishmaniosis canina es una enfermedad parasitaria endémica en toda el área mediterránea. Su curso clínico se caracteriza por su cronicidad y por la gran variedad de síntomas que puede provocar. Parte de este pleomorfismo clínico puede atribuirse a los fenómenos inmunopatológicos que el parásito desencadena en los perros donde la respuesta inmune no es protectora. Dentro de esta categoría se incluye el desarrollo de anticuerpos antinucleares (ANA) pero nunca se ha establecido la especificidad antigénica de estos ANA ni se ha estudiado su correlación con procesos inmunopatológicos graves para el animal como glomerulonefritis inmunomediada.

Nuestros objetivos en este trabajo han sido establecer la prevalencia de títulos positivos de ANA en perros con leishmaniosis y determinar los isotipos de inmunoglobulinas que los forman. En segundo lugar, investigar la especificidad antigénica de los ANA presentes en la leishmaniosis canina, especialmente la asociación entre ANA anti-histonas y el desarrollo de insuficiencia renal y glomerulonefritis. Una parte de los animales incluidos lo fueron de forma retrospectiva, mientras que otra parte de la población estudiada se incluyó de forma prospectiva.

La prevalencia de títulos positivos de ANA se estableció por IFI usando como substrato criocortes de hígado de rata (60 perros) y cultivos de células Hep-2 (67 perros). En el primer caso, la prevalencia de ANA fue del 23,3% mientras que usando cultivos de células Hep-2

la prevalencia de títulos positivos se elevó hasta el 52,23%. Los títulos oscilaron entre 1:40 (18 perros) y 1:640 (1 perro). Tres muestras alcanzaron un título de 1:80, otras 3 muestras de 1:160 y en 10 perros se obtuvo un título final de 1:320. Sólo tres tipos de patrones de inmunofluorescencia pudieron ser definidos claramente: nuclear, nucleolar y citoplasmático. La mayoría de los perros presentaron sólo un tipo de patrón. El patrón nuclear fue el patrón predominante al estar presente en 15 animales, otros 11 presentaron un patrón citoplasmático y finalmente en 6 animales el patrón fue nucleolar. En 3 ocasiones, las muestras presentaron un patrón mixto que siempre fue una combinación de patrón nuclear y citoplasmático. Las dos técnicas de inmunofluorescencia mostraron una correlación positiva en 7 de las 24 (29%) muestras analizadas.

Los isotipos de inmunoglobulinas implicados en la formación de ANA se investigaron mediante una modificación de la técnica de IFI empleando como substrato criocortes de hígado de rata. Sólo en 4 de los 14 perros estudiados, los ANA correspondían a un solo isotipo. La mayoría de animales presentaron ANA de dos isotipos diferentes, por lo general IgG e IgM y en ningún caso se detectó la presencia de los 3 isotipos en una misma muestra. Seis perros presentaron ANA de los isotipos IgG e IgM, cuatro presentaron al mismo tiempo ANA de los isotipos IgM e IgA, otro perro presentaba únicamente ANA IgG y finalmente 3 perros presentaron únicamente ANA del isotipo IgM.

Se investigó la especificidad antigénica de los ANA para los antígenos ADN de doble cadena (34 perros) mediante IFI usando como substrato cultivos del protozoo *Crithidia luciliae*; antígenos nucleares solubles (ENA) de los tipos nRNP y Sm mediante la técnica de doble difusión de Ouchterlony (34 perros) y para histonas mediante un método ELISA no competitivo (92 perros). Los títulos de ADN-dc fueron negativos en todos los animales salvo en un perro que presentó fluorescencia con un título de 1:80, mientras que ninguna muestra desarrolló líneas de precipitación para los ENA estudiados. Del total de muestras de perros con leishmaniosis analizadas (N=93), 43 muestras (46,23%) presentaron una concentración de anticuerpos IgG anti-histonas elevada. Un tercio aproximadamente (32,5%) de las reacciones positivas se clasificaron como positivos débiles (N = 14); en 19 perros (44,18%) las reacciones se consideraron moderadas, y 10 perros (23,2%) presentaron concentraciones consideradas como altas según la escala establecida.

Finalmente, para estudiar la asociación entre ANA anti-histonas y glomerulonefritis se formaron con carácter prospectivo dos grupos: perros sin signos de glomerulonefritis y perros con signos de glomerulonefritis, basando el diagnóstico de glomerulonefritis fundamentalmente en la presencia de un cociente elevado de proteínas/creatinina en orina. Estadísticamente, la proporción de perros con niveles elevados de anticuerpos anti-histonas fue significativamente mayor en el grupo de perros con signos de

glomerulonefritis ($P < 0,0011$; test exacto de Fisher). Del mismo modo, cuando se compararon las concentraciones de anticuerpos anti-histonas expresadas en unidades ELISA, las diferencias fueron también estadísticamente significativas (test de Mann-Whitney), con una concentración media superior en el grupo de perros con leishmaniosis y glomerulonefritis.

Los niveles de anticuerpos anti-histonas y el cociente UPC presentaron un coeficiente de correlación positivo moderado ($r = 0,3058$) y estadísticamente significativo ($P = 0,0461$) cuando se analizaron conjuntamente los perros de ambos grupos. Sin embargo, no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones séricas de creatinina y los niveles de anticuerpos anti-histonas. Igualmente, cuando ambos grupos se analizaron separadamente, no se encontraron coeficientes de correlación estadísticamente significativos para las variables estudiadas en ninguno de los grupos. El valor predictivo positivo de niveles elevados de anticuerpos anti-histonas como riesgo del desarrollo de glomerulonefritis fue del 88%. Según este valor, el 88% de perros con leishmaniosis y niveles elevados de anticuerpos anti-histonas desarrollarían glomerulonefritis.

En general, por sus títulos bajos, falta de especificidad y de asociación con síntomas clínicos concretos, los anticuerpos antinucleares constituyen un epifenómeno asociado a la leishmaniosis

canina, cuya relevancia clínica parece limitada salvo en el caso de los anticuerpos anti histonas. La determinación de anticuerpos antinucleares anti-histonas puede tener interés clínico para valorar el riesgo de desarrollar glomerulonefritis inmunomediada en perros con leishmaniosis.

SUMMARY

Canine leishmaniasis is a parasitic disease endemic in the mediterranean basin. Its clinical course is chronic and characterized by a great variety of clinical signs.

This clinical pleomorphism may be partly explained by the immunopathologic mechanisms triggered during the infection in those dogs which develop a predominantly humoral non-protective immune response. Included in these immunopathologic mechanisms are the antinuclear antibodies (ANA); neither their antigenic specificity nor their correlation with serious immunomediated processes such as glomerulonephritis has been established in canine leishmaniosis.

Our aim in this work was to determine the prevalence of positive ANA titres in dogs with leishmaniosis and the distribution of immunoglobulin isotypes involved in their formation. Another objective was to investigate the association between anti-histone ANA and the development of renal failure and glomerulonephritis. Some of the animals were included retrospectively whereas when it was possible the dogs were included prospectively.

The prevalence of positive ANA titres was determined using indirect immunofluorescence assay (IFI) with rat liver cryocuts (60 dogs) or cultured Hep-2 cells as substrate (67 dogs). Using the first method, the ANA prevalence was 23.3%, lower than using Hep-2 cells which yielded a prevalence of 52.23%. The titres with this last method

ranged between 1:40 (18 dogs) and 1:640 (1 dog). Three samples had a titre of 1:80, another three samples 1:160 and in 10 dogs the final titre was 1:320. Only three immunofluorescence patterns could be clearly defined: nuclear homogeneous, nucleolar and cytoplasmic. Most dogs showed a single pattern. The nuclear pattern predominated being present in 15 dogs; another 11 dogs had a cytoplasmic pattern and only 6 dogs showed a nucleolar immunofluorescence pattern. Three samples had a mixed pattern, always a combination of a nuclear and cytoplasmic pattern. Both immunofluorescence techniques showed a positive concordance in 7 out of 24 samples (29%) analysed.

The immunoglobulin isotypes involved in ANA formation were investigated by modifying the IFI method using rat liver cryocuts as substrate. Only in 4 of the 14 dogs analysed ANA were composed by just one isotype. Most of the animals had ANA corresponding to two different isotypes, usually IgG and IgM and none of the samples had ANA of the three isotypes investigated. Six dogs showed ANA of the IgG and IgM isotype, another dog had only IgG ANA and finally three dogs showed only IgM ANA.

The antigenic specificity of the ANA was investigated for the antigens ds-DNA (34 dogs) by an IFI method using cultures of the protozoan *Crithidia luciliae*, extractable nuclear antigens (ENA) nRNP and Sm by the double immunodiffusion Ouchterlony method (34 dogs) and histones using a non-competitive sandwich ELISA (93 dogs). The

ds-DNA titres were negative for all the samples analysed but one, which showed a positive titre of 1:80, similarly, none of the samples showed precipitation antibodies for the ENA assayed. Concerning the anti-histones ANA, from the total of 93 samples analysed, 43 of the samples (46.23%) had increased IgG anti-histones ANA. One third (32.5%) of the positive reactions were classified as weak positives (N=14); in, 19 dogs (44.18%) reactions were considered as moderate and in 10 dogs (23.2%) the anti-histone ANA concentrations could be considered as high.

Finally, in order to study the relationship between anti-histone ANA and glomerulonephritis, two groups of dogs were selected prospectively; dogs without signs of glomerulonephritis and dogs with signs of glomerulonephritis. The diagnosis of glomerulonephritis was mainly based on the presence of a high protein/creatinine urinary ratio. Statistically, the ratio of dogs with high anti-histone ANA serum levels was significantly higher in dogs with leishmaniosis and glomerulonephritis ($P < 0.0011$; Fisher exact test). Similarly, when the anti-histone ANA concentrations expressed as ELISA units were compared, differences were also statistically significant (Mann-Whitney test) with a higher mean concentration in the group of dogs with leishmaniosis and glomerulonephritis.

The levels of anti-histone antibodies and the UPC ratio showed a correlation coefficient of moderate intensity ($r = 0.3058$) and

statistically significant ($P < 0.0461$) when all dogs were analysed as a single group. However, correlation between creatinine serum levels and anti-histone antibodies was not statistically significant. Similarly, when both were separately analysed, the coefficients of correlation were not statistically significant for the two associations studied. The predictive value of increased anti-histone antibodies as a risk to develop glomerulonephritis was 88%. According to this parameter, 88% of the dogs with leishmaniosis and increased anti-histone antibodies will develop glomerulonephritis.

As a final conclusion, due to the generally low ANA titres found, their lack of specificity and absence of a direct association with specific clinical signs, ANA in canine leishmaniosis seem to represent an epiphenomenon of the disease, with a limited clinical relevance except anti-histone ANA. The determination of anti-histone ANA may be of clinical interest to predict the development of immunomediated glomerulonephritis in dogs with leishmaniosis.

REFERENCIAS

A

1. **Adu D, Williams DG, Quakyi IA, Voller A, Anim-Addo Y, Bruce-Tagoe AA, Johnson GD, Holborow EJ.** Anti ss-DNA and antinuclear antibodies in human malaria. *Clin Exp Immunol*, 1982;49:310-316.
2. **Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, Decolmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, Portus.** Diagnostic potential of western-blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg*, 1999;58:154-159.
3. **Akuffo HO, Britton FF.** Contribution of non-leishmania-specific immunity to resistance to leishmania infection in humans. *Clin Exp Immunol*, 1992;87:58-64.
4. **Alarcón Segovia D, Fishbein E, Betancourt VM.** Antibodies to nucleoprotein and to hydrazide-altered soluble nucleoprotein in tuberculous patients receiving isoniazid. *Clin Exp Immunol*, 1969;5:429-437.
5. **Alarcón Segovía D.** Drug-induced antinuclear antibodies and lupus syndromes. *Drugs*, 1976;12:69-77.

6. **Alarcón-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Fishbein E.** Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature*, 1978;271:67-69.
7. **Allen RC, Dewez P, Stuart L, Gatenby PA, Sturgess A.** Antinuclear antibodies using Hep-2 cells in normal children and in children with common infections. *J Paediatr Child Health*, 1991;27(1):39-42.
8. **Alvar J, Amela C, Molina R.** El perro como reservorio de la leishmaniosis. *Medicina Veterinaria*, 1995;12:431-438.
9. **Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andres MD, Boggio J, Rodríguez F, Saíinz A, Escacena C.** Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Trop Med and Parasitol*, 1994;88:371-378.
10. **Amusategui I, Saíinz A, Rodríguez F, Tesouro MA.** Tratamiento de la leishmaniosis canina. Parte I. *Medicina Veterinaria*, 1995;12:289-298.

11. **Amusategui I, Sáinz A, Rodríguez F, Tesouro MA.** Tratamiento de la leishmaniosis canina. Parte II. Medicina Veterinaria, 1995;12:373-383.
12. **Amusategui I, Sáinz A, Rodríguez F, Tesouro MA.** Valoración y comparación de la respuesta terapéutica. Consulta de Difusión Veterinaria, 2000;8:71-78.
13. **Andersson M, Sevelius E.** Circulating autoantibodies in dogs with liver disease. J Small Anim Pract, 1992;33:389-394.
14. **Anjili CO, Olobo JO, Mbatia PA, Robert L, Githure JI.** Experimental infection of domestic goats with *Leishmania major* through bites of infected *P. duboscoi* and needle inoculation of culture derived promastigotes. Vet Res Communic, 1994;18:301-305.
15. **Arboix M, Valladares JE.** Terapéutica de la leishmaniosis canina. Canis et Felis, 1997;29:65-81.
16. **Argov S, Jaffe CL, Slor KH, Shoenfeld Y.** Autoantibody production by patients infected with leishmania. Clin Exp Immunol, 1989;76:190-197.

17. **Arroyave CM, Giambrone MJ, Rich KC, Walaszek M.** The frequency of antinuclear antibody (ANA) in children by use of mouse kidney (MK) and human epithelial cells (Hep-2) as substrates. *J Allergy Clin Immunol*, 1988;82:741-744.

18. **Ashford DA, David JR, Freire M, Sherlock I, Eulalio MD, Sampaio DP, Badaro R.** Studies on control of visceral leishmaniasis. Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 1998;59:53-57.

19. **Astion ML, Wener MH, Hutchinson K.** Advances in autoantibody testing. *LabMedica Int*, 2000;Dec:6-8.

20. **Avila JL, Rojas M.** Elevated cerebroside antibody levels in human visceral and cutaneous leishmaniasis, *Trypanosoma rangeli* infection and chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, 1990;43:52-60.

21. **Avrameas S, Guilbert B, Dighiero G.** Natural antibodies against tubulin, actin, myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia may express similar antibody specificities. *Ann Immunol*, 1981;132 C:231-236.

22. **Avrameas S, Ternynck T.** Natural autotantibodies: the other side of the immune system. *Res Immunol*, 1995;146:235-248.

B

23. **Barnes JC, Stanley O, Craig TM.** Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *J Am Vet Med Assoc*, 1993;202:416-418.
24. **Barral-Netto M, Barral A, Santos SB, Carvalho EM, Badaro R, Rocha H, Reed SG, Johnson WD.** Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 1991;147:281-284.
25. **Barta O, Barta V.** Antinuclear antibody (ANA) testing. En: *Monographs in animal immunology Vol 2. Veterinary Clinical Immunology Laboratory.* Bar-Lab Inc: Blackburg, 1993; section D1.
26. **Basselin M, Badetdenisot MA, Lawrence F, Robertgero M.** Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated and pentamidine-resistant leishmania. *Exp Parasitol*, 1997;85:274-282.

27. **Bates PA.** The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*, 1994;79:215-218.
28. **Beaucher WN, Garman RH, Condeemi JJ.** Familial lupus erythematosus. Antibodies to DNA in household dogs. *New Engl J Med*, 1977;296:982-984.
29. **Beck JS.** Variations in the morphological patterns of autoimmune nuclear fluorescence. *The Lacent*, 1961;jun 3:1203-1205.
30. **Bell SC, Hughes DE, Bennet D, Bari ASM, Kelly D, Carter SD.** Analysis and significance of antinuclear antibodies in dogs. *Res Vet Sci*, 1997;62,83-84.
31. **Beneson AS. Leishmaniasis cutánea.** En: *El control de las enfermedades transmisibles en el hombre 3ªed*, Organización Panamericana de Salud, Washington, 1983;249-254.
32. **Benderitter T, Casanova P, Nashkidachvili I, Quilici M.** Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 1988;82:335-341.

33. **Bendixen G, Hadidi T, Manthorpe R, Permin H, Struckmann J, Wiik A, Zaghoul M.** Antibodies against nuclear components in schistosomiasis. *Allergy*, 1984;39:107-113.
34. **Bentwich Z, Beverly PCL, Hammarstrom L, Kalden JR, Lambert PH, Rose NR, Thompson RA.** *Clin Immunol Immunopathol*, 1988;49:478-497.
35. **Berenger A.** Proposition d'une modalité particulière de traitement de la leishmaniose canina. Guérison possible. *Prat Med Chir Anim Cie*, 1988;supp(5): 111-119.
36. **Bergeaud P.** L'apport de la corticothérapie dans le traitement de certaines formes de leishmaniose canine: résultats sur une série de quarante-trois cas. *Prat Med Chir Anim Cie*, 1988;supp(5):121-127.
37. **Binbazim A, Chapman WL, Shin SS, Hanson WL.** Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania infantum* in hamsters and dogs. *Am J Vet Res*, 1993;54:113-121.

38. **Blackwell JM, Ezerowitz RAB, Roberts MB, Ghannon JY, Sim RB, Gordon S.** Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J Exp Med*, 1985;162:324-331.
39. **Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E.** Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. *J Small Anim Pract*, 1997;38:29-30.
40. **Buranakarl C, Ankanaporn S, Thammacharoen S, Trisiroj M.** Relationships between degree of azotaemia and blood pressure, urinary protein: creatinine ratio and fractional excretion of electrolytes in dogs with renal azotaemia. *Vet Res Communications*, 2007;31:245-257.
41. **Bogdan C, Schroppel K, Lohoff M, Rollingshoff M, Solbach W.** Immunization of susceptible hosts with a soluble antigen fraction from *Leishmania major* leads to aggravation of murine leishmaniasis mediated by CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 1990;20:2533-2540.
42. **Bourdeau P.** Eléments de la relation hôte-parasite au cours de l'infection leishmanienne et conséquences. *Prat Med Chir Anim Cie*, 1988;supp(5):57-72.

43. **Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L.** Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997;59:21-30.
44. **Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP.** Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest*, 1997;9:439-440.
45. **Bradwell AR, Stokes RP, Johnson GD.** Atlas of Hep-2 patterns. The Binding Site., 1995.
46. **Brandonisio O, Altamura M, Carelli G, Ceci L, Antonaci S, Jirillo E.** Lymphocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Immunol Immunopharmacol*, 1989;9:37-40.
47. **Brandonisio O, Ceci L, Bufo P, Antonaci S, Jirillo E.** Immunological profile of *Leishmania* infection. Spontaneous canine leishmaniasis: a useful model for studying the immune response in human leishmaniasis. *Immunol Immunopharm*, 1985;5:176-181.

48. **Brandonisio O, Carelli G, Altamura M, Varvara B, Ceci L.** Circulating immune complexes and autoantibodies in canine leishmaniasis. *Parassitologia*, 1990;32:275-281.
49. **Bray RS.** Leishmania. *Annu Rev Microbiol*, 1974;28:188-217.
50. **Bryceson AD.** Immunological aspects of clinical leishmaniasis. *Proc Roy Soc Med*, 1970;63:1056-1060.

C

51. **Cairó J.** Aspectos clínicos de la leishmaniosis canina. *Canis et Felis*, 1997;29:53-63.
52. **Cabral M, Ogrady JE, Gomez S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J.** The immunology of canine leishmaniasis – Strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 1998;76:173-180.
53. **Carvalho EM, Andrew BS, Martinelli R, Dutra M, Rocha H.** Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 1983;32:61-68.

54. **Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD.** Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*, 1989;83:860-864.
55. **Cazelles C, Montagner C.** Deux cas de filariose cutanée associée a une leishmaniose. *Point Vet*, 1995;27:343-345.
56. **Ceci L, Brandonisio O, Carelli G.** Anticorpi anti-muscolo cardiaco nella leishmaniose del cane. *Parassitologia*, 1988;30(supp 1):49-50.
57. **Ceci L, Petazzi F, Guidi G, Corazza M.** Modificazioni immunoelettroforetiche in cani affetti da leishmaniosi. *La Clinica Veterinaria.*, 1985;108:268-277.
58. **ChabanneL, Cadoré JL, Fournel C.** Les examens en immunorhumatologie. *Le Point Veterinaire*, 1995;26:45-53.
59. **Chapman WL, Hansson WL, Waits VB, Kinnamon KE.** Antileishmanial activity of selected compounds in dogs experimentally infected with *Leishmania donovani*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1979;21:189-193.

60. **Chapman WL, Hansson WL, Alving CR, Hendricks LD.** Antileishmanial activity of liposome-encapsulated meglumine antimonate in the dog. *Am J Vet Res*, 1984;45:1028-1030.

61. **Ciaramella P, Oliva G, DeLuna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A.** A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected. *Vet Rec*, 1997;141:539-543.

62. **Codner EC, Maslin WR.** Investigation of protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am J Vet Res*, 1992;53:294-299.

63. **Costa O, Fournel C, Lotchouang E, Monier JC, Fontaine M.** Specificities of antinuclear antibodies detected in dogs with systemic lupus erythematosus. *Vet Immunol Immunopathol*, 1984;7:369-382.

64. **Costa FA, Guerra JL, Silva SM, Klein RP, Mendoca IL, Goto H.** CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz J Med Bio Res*, 2000;33:1455-1458.

D

65. **Davis KA, Chapman PT, Norsworthy PJ, Jamar F, Athanassiou P.** Clearance pathways of soluble immune-complexes in the pig- insights into the adaptative nature of antigen clearance in humans. *J Immunol*, 1995;155:5760-5768.
66. **Day M.** Mechanisms of immune-mediated disease in small animals. *In Practice*, 1998 (Feb):75-86.
67. **Day MJ.** IgG subclasses of canine anti-erythrocyte, antinuclear and anti-thyroglobulin autoantibodies *Res Vet Sci*, 1996; 61:129-135.
68. **Decker-Jackson JE, Honigberg BM.** Glycoproteins released by *Leishmania donovani*: Immunologic relationships with host and bacterial antigens and preliminary biochemical analysis. *J Protozool*, 1978;25:514-525.
69. **DeLuna R, Ferrante M, Severino L, Ambrosio R, Piadentosi D, Gradoni L, Lucisano A, Persechino A.** Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *J Comp Pathol*, 2000;122:213-216.

70. **Denerolle P.** Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). *Prat Med Chir Anim Cie*, 1996;31:137-145.
71. **Denerolle P, Bourdoiseau G.** Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*, 1999;13:413-415.
72. **Deniau M, Durand R, Bories C, Paul M, Astier A, Couvreur P, Houin R.** Etude in vitro de médicaments leishmanicides vectorisés. *Ann Parasitol Hum Comp.*, 1993;68:34-37.
73. **Deplazes P, Smith N, Arnold P, Lutz H, Eckert J.** Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol*, 1995;17:451-458.
74. **Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R.** Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*, 1997;25:1240-1242.
75. **DiBartola, S.P.** Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease. In: Ettinger, S.J., Feldman, E., (Eds.), *Textbook of*

veterinary internal medicine 5th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 2000; pp. 1600-1614.

76. **Dogra J, Saxena VN.** Itraconazole and Leishmaniasis. A randomized double-blind trial in cutaneous disease. *Int J for Parasitology*, 1998;26:1413-1415.

E

1. **Epstein WA, Tan M, Easterbrook M.** Serum antibody to double-stranded RND and DNA in patients with idiopathic and secondary uveitis. *New Engl J Med*, 1971;285:1502-1506.
2. **Esterre P, Guerret Síntomas, Ravisse P, Dimier-David L, Dedet JP, Grimaud JA.** Immunohistochemical analysis of the mucosal lesion in mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite*, 1994;1:305-309.
3. **Euzeby J.** Thérapeutique actuelle et nouveaux concepts. *Prat Med Chir Anim Cie*, 1988; supp(5):103-110.

F

4. **Font A, Closa JM, Mascort J.** Monoclonal gammopathy in a dog with visceral leishmaniasis. *J Vet Intern Med*, 1994;8:233-235.
5. **Font A, Roura X, Fondevila D, Closa JM, Mascort J, Ferrer L.** Canine mucosal leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc*, 1996;32:131-137.
6. **Ferrer L.** Leishmaniasis. En: *Terapéutica veterinaria de pequeños animales Vol XI*. Eds. RW Kirk, JD Bonagura. Interamericana-McGraw-Hill, 1994, 266-270.
7. **Ferrer L, Fondevila D, Marco A, Pumarola M.** Atypical leishmaniasis in two dogs. *Vet Rec*, 1990;126:90.
8. **Ferrer L, Juanola B, Ramos JA, Ramis A.** Chronic colitis due to leishmania infection in two dogs. *Vet Pathol*, 1991;28:342-343.
9. **Ferrer L, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M.** Skin lesions in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 1988;29:381-388.
10. **Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L.** Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997;56:319-327.

11. **Fritzler MJ.** Immunofluorescent antinuclear antibody test. In Rose NR, Conway E, Fahey JL, Friedman H, Penn GM. Manual of clinical laboratory immunology, 4th ed., 1992:724-734.
12. **Fusal T, Deniau M, Durand R, Bories C, Paul M, Rivollet D, Asther A, Houin R.** Action of pentamidine-bound nanoparticles against Leishmania on an *in vivo* model. Parasite, 1994;1:319-324.

G

13. **Gállego-Culleré M.** Los flebotomos vectores de la leishmaniosis canina. Consideraciones generales. Canis et Felis, 1997;29:21-31.
14. **Gállego-Berenger J, Botet-Fregola J, Gállego-Culleré M, Portús-Vinyeta M.** Los flebotomos de la España peninsular e islas baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. En: In memoriam al profesor F.P. Martínez Gómez. Córdoba, 1992: 581-599.
15. **Galvao-Castro B, Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi SG, Coutinho SG, Lambert PH.** Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. Clin Exp Immunol, 1984;56:58-66.

16. **García-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C, Navarrete I.** Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during leishmania infection in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunology*, 1996;18:539-546.
17. **Garnham PCC, Humphrey JH.** Problems in leishmaniasis related to immunology. *C T in Microbiology*, 1985;48:29-42.
18. **George JW, Nielsen SW, Shively JN, Hopek S, Mroz S.** Canine leishmaniasis with amyloidosis. *Vet Pathol*, 1976;13:365-373.
19. **Giauffret A, Taliercio YP.** Mise en évidence d'anticorps sériques chez le chien atteint de leishmaniose, par une technique d'immunofluorescence indirecte. *Rec Med Vet*, 1971;147:141-151.
20. **Ginel PJ, Mozos E, Fernández A, Martínez A, Molleda JM.** Canine penphigus foliaceus associated with leishmaniasis. *Vet Rec*, 1993;133:526-527.
21. **González EN, Rothfield NR.** Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *New Eng J Medicine*, 1966;274:1332-1338.

22. **Gradoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S.** Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 1988;82:568-571.
23. **Grootscholten, C, van Bruggen, MCJ, van der Pijl, JW, de Jong, EMGJ, Ligtenberg, G, Derksen, RHWM, Berden JHM.** Deposition of nucleosomal antigens (histones and DNA) in the epidermal basement membrane in human lupus nephritis. *Arthritis Rheum*, 2003;48:1355-1362.
24. **Goodman HC, Fahey JL, Malmgren RA.** Serum factors in lupus erythematosus and other diseases reacting with cell nuclei and nucleoprotein extracts: electrophoretic, ultracentrifugal and chromatographic studies. *J Clin Invest*, 1960;39:1595-1605.
25. **Gorman NT, Werner LL.** Immune-mediated diseases of the dog and cat. I. Basic concepts and the systemic immune-mediated diseases. *Br Vet J*, 1986;142:395-402.
26. **Gothe R, Nolte I, Kraft W.** Leishmaniose des hundes in deutschland: epidemiologische fallanalyse und alternative zur bisherigen kauasalen therapie. *Tierarztl Prax*, 1997;25:68-73.

27. **Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Alvar J, Castillo M.** Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci*, 2000;69:249-253.
28. **Guy M, Bailey W, Snowden K.** Canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 1993;133:396.

H

29. **Hahn BH.** Antibodies to DNA. *New England J Medicine*, 1998;338:1359-1368.
30. **Hailu A.** Pre- and post-treatment antibody levels in visceral leishmaniasis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 1990;84:673-675.
31. **Hall AP, Bardawil WA, Bayles TB, Mednis AD, Galins N.** The relations between the antinuclear, rheumatoid and L.E.-Cell factors in the systemic rheumatic diseases. *New Engl J Med*, 1960;263:769-775.
32. **Halliwell REW.** Autoimmune diseases in domestic animals. *J Am Vet Med Assoc*, 1982;181:1088-1096.

33. **Hansson H.** Antinuclear antibodies: presence and specificity in autoimmune connective tissue disease in the dog. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999;69:225-228.
34. **Hansson H, Karlsson-Parra A.** Canine antinuclear antibodies: comparison of immunofluorescence staining patterns and precipitin reactivity. *Acta Vet Scand*, 1999;40(3):205-212.
35. **Hansson H, Trowald-Wigh G, Karlsson-Parra A.** Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence in dog sera: comparison of rat liver tissue and human epithelial-2 cells as antigenic substrate. *J Vet Int Med*, 1996;10:199-203.
36. **Hernández S, Martínez-Moreno A.** Leishmaniosis canina. En: Sanmartín ML, ed. *Avances en parasitología*: Universidad de Santiago de Compostela, 1992;93-120.
37. **Henriksson EW, Hansson H, Karlsson-Parra A, Pettersson I.** Autoantibody profiles in canine ANA-positive sera investigated by immunoblot and ELISA. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998;61:157-170.
38. **Holian J, Griffiths ID, Glass DN, Maini RN, Scott JT.** Human anti-DNA antibody: reference standards for diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 1975;34:438-443.

39. **Hoover DL, Berger M, Nancy CA, Hockmeyer WT, Meltzer MS.** Killing of *Leishmania tropica* amastigotes by factors in normal human serum. *J Immunol*, 1984;132:893-897.
40. **Hommel M.** The genus *Leishmania*: biology of the parasites and clinical aspects. *Bulletin de L'Institut Pasteur*, 1978;75:5-102.

J

41. **Jones DRE.** Canine systemic lupus erythematosus: new insights and their implications. *J Comp Path*, 1993;108:215-228.

K

42. **Kager PA, Plas-Van Dalen C, Rees PH, Helmerhorst FM, Borne AEGK.** Red cell, white cell and platelet autoantibodies in visceral leishmaniasis. *Trop Geogr Med*, 1984;36:143-150.
43. **Kager PA, Rees PH, Manguyu FM, Bhatt KM, Wellde BT, Hockmeyer WT, Lyerly WH.** Clinical, haematological and parasitological response to treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. A study of 64 patients. *Trop Geogr Med*, 1984;36:21-35.

44. **Kass PH, Strombeck DR, Farver TB, Ardans AA.** Application of the log-linear model in the prediction of the antinuclear antibody test in the dog. *Am J Vet Res*, 1985;46:2336-2339.
45. **Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ.** Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. *Vet Pathol*, 1984a;21:74-79.
46. **Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ.** Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. II. Pathology. *Vet Pathol*, 1984b;21:80-86.
47. **Kelly PJ, Carter SD, Bobade PA, Matthewman LA, Bell SC.** Absence of antinuclear antibodies in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Rec*, 1994;134:382.
48. **Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pinelli E, Del Real G, Molina R, Vitutia MM, Cañavate MC, Nieto J.** A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, 1994;1:311-318.

49. **Koffler D.** Lupus eritematoso sistémico. *Investigación y Ciencia*, 1980;314-325.
50. **Kontos VJ, Koutinas AF.** Old world canine leishmaniasis. *Comp Cont Educ*, 1993;15:949-959.
51. **Koutinas AF, Kontos V, Kaldrimidou H, Lekkas S.** Canine leishmaniasis-associated nephropathy: a clinical, clinicopathologic and pathologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria. *Bulletin HVMS*, 1994;45:131-140.
52. **Koutinas AF, Scott DW, Kontos V, Lekkas S.** Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): A clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet Derm*, 1993;3:121-130.
53. **Kraft W, Bauer G.** Akute Pankreopathien als Nebenwirkungen der Leishmaniose-Therapie?. *Kleintierpraxis*, 1994;39:309-310.
54. **Kumagai S, Hayashi N.** Immunofluorescence-still 'the gold standard' in ANA testing?. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2001;235:77-83.

L

55. **Lamothe J.** Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotericine B (39 cas). *Prat Med Chir Anim Cie*, 1997;32:133-141.
56. **Lapras M, Monier JC.** Technique d'immunofluorescence appliquee au diagnostic des maladies auto-immunes chez le chien. *Revue Med Vet*, 1971;122:973-989.
57. **Laruelle-Magalon C, Toga I.** Un cas de leishmaniose felina. *Prat Med Chir Anim Cie*, 1996;31:255-261.
58. **Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW.** Duncan and Prasse's Laboratory Medicine: Clinical Pathology 4th ed. Ames, IA: Iowa State University Press 2002:235-238.
59. **Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romao P, Cortes S, Rolao N, Gomez-Pereira S, Rica Capela MJ, Abranches P.** Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 2001;79:273-284.
60. **Lester SJ, Kenyon JE.** Use of allopurinol to treat visceral leishmaniosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 1996;209:615-617.

61. **Lira R, Rosales-Encina JL, Arguello C.** Leishmania mexicana-binding of promastigotes to type-I collagen. *Exp Parasitol*, 1997;85:149-157.
62. **Liste F, Gascón M.** Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Rec*, 1995;137:23-24.
63. **Litwin SD, Singer JM.** Studies of the incidence and significance of anti-gamma globulin factors in the aging. *Arthritis and Rheum*, 1965;8:538-550.
64. **Locksley RM, Heinzel FP, Holaday BJ, Mutha SS, Reiner SL, Sadick MD.** Induction of Th1 and Th2 CD4+ subsets during murine Leishmania major infection. *Res Immunol*, 1991;142:28-32.
65. **Longstaffe JA, Guy MW.** Canine leishmaniasis-United Kingdom update. *J Small Anim Pract*, 1988;28:663-671.
66. **Longstaffe JA, Jefferies AR, Kelly DF, Bedford PGC, Herrtage ME, Darkes PGG.** Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom: a potential human health hazard. *J Small Anim Pract*, 1983;24:23-30.

67. **Lowry OH, Nira J, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1955;193:265-275.
68. **Lozano-Maldonado J, Campos-Bueno M, Mañas-Almendros F, Jiménez-Gómez F, González-Castro J.** Seroepidemiología de la toxoplasmosis y leishmaniosis canina en la provincia de Almería. En: In memoriam al profesor F.P. Martínez Gómez. Córdoba, 1992, 109-117.
69. **Lucena R, Ginel P, López R, Novales M, Martín E, Molleda JM.** Antinuclear antibodies in dogs with leishmaniosis. *J Vet Med A*, 1996;43:255-259.
70. **Lucena R, Ginel PJ.** Immunoglobulin isotype distribution of antinuclear antibodies in dogs with leishmaniosis. *Res Vet Sci*, 1998,65:205-207.

M

71. **Maarouf M, Lawrence F, Croft SL, Rober-Gero M.** Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitol Res*, 1995;81:421-425.

72. **Macri B, Conte F.** On renal, genital and thymical localizations during canine leishmaniasis. Pathogenetic considerations. Rivista Parassitologia, 1989;6:17-21.
73. **Macri B, Guarda F.** Su un caso di leishmaniosi nel cane. Schweiz Arch Tierheilk, 1987;129:265-270.
74. **Macri B, Guarda F, Panebianco A.** Leishmaniosi e neoplasie nel cane. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, 1987;32:3-14.
75. **Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S.** Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 1988;82:566-567.
76. **Mancianti F, Mignone W, Galastri F.** Serologic survey for leishmaniasis in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. J Wildlife Dis, 1994;30:454-456.
77. **Mancianti F, Poli A, Bionda A.** Analysis of renal immune deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. Parassitologia, 1989;31:213-230.
78. **Manna L, Reale S, Viola E, Licitra G, Cascone G, Roperto S, Gravino AE.** Detection of *Leishmania infantum* DNA in canine

urine samples by real-time PCR Third World Congress on leishmaniosis, Palermo 10-15 April, 2005, 164.

79. **Margarito JM, Ginel PJ, Molleda JM.** Haemangiosarcoma associated with leishmaniasis in three dogs. *Vet Rec*, 1994;134:66-67.
80. **Marr JJ.** Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and american trypanosomiasis. *J Lab Clin Med*, 1991;118:111-119.
81. **Martínez-Cruz MS, Moreno-Montáñez T, Gutiérrez P, Martínez Moreno FJ.** Alteraciones de las proteínas séricas en la leishmaniosis visceral canina. En: *In memoriam al profesor F.P. Martínez Gómez*. Córdoba, 1992: 151-155.
82. **Martínez-Moreno A, Acosta García I, Becerra Martell C, Hernández Rodríguez S.** Estudio clínico-analítico de la leishmaniosis canina experimental. En: *In memoriam al profesor F.P. Martínez Gómez*. Córdoba, 1992: 159-169.
83. **Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S.** Humoral and cell-mediated immunity in natural

and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 1995;48:209-220.

84. **Mauel J.** Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv in Parasitol*, 1996;38:1-50.
85. **McVey DS, Shuman W.** Use of multiple antigen substrates to detect antinuclear antibody in canine sera. *Vet Immunol Immunopathol*, 1991;28:37-43.
86. **Miescher PA, Belehu A.** Leishmaniasis: hematologic aspects. *Seminars in Hematology*, 1982;19:93-99.
87. **Miller MH, Littlejohn GO, Jones BW, Strnad H.** Clinical comparison of cultured human epithelial cells and rat liver as substrates for the fluorescent antinuclear antibody test. *J Rheumatol*, 1985;12:265-269.
88. **Monestier M, Novick KE, Karam ET, Chabanne L, Monier JC, Rigal D.** Autoantibodies to histone, DNA and nucleosome antigens in canine systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 1995;99:37-41.

89. **Monier JC, Fournel C, Lapras M, Dardenne M, Randle T, Fontaine CM.** Systemic lupus erythematosus in a colony of dogs. *Am J Vet Res*, 1988;49:46-51.

90. **Moreno J, Nieto J, Chamizo C, González F, Blanco F, Barker DC, Alva J.** The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis, before, and after chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999;71:181-195.

91. **Morillas F, Sanchis-Marín MC, Acedo-Sánchez C, Morillas-Márquez A, Martín-Sánchez J.** Encuesta seroepidemiológica sobre la leishmaniosis canina e infección del flebotomo vector por leishmania en la provincia de Almería. En: *In memoriam al profesor F.P. Martínez Gómez*. Córdoba, 1992, 135-145.

92. **Morillas F, Sanchez-Carrasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, Sanchiz-Marín MC.** Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitological Res*, 1996;82:569-570.

93. **Morse JH, Müller-Eberhard, Kunkel HG.** Antinuclear factors and serum complement in systemic lupus erythematosus. *Bull N Y Acad of Med*, 1962;38:641-651.

94. **Mosser DM, Edelson PI.** The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*, 1987;327:329-331.
95. **Mozos E, Pérez J, Day MJ, Lucena R, Ginel PJ.** Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. *J Comp Path*, 1999;120:257-268.

N

96. **Naskidachvili L, Peroux F.** La pathologie rénale chez le chien leishmanien. *Prat Med Chir Anim Cie*, 1988;supp(5):43-47.
97. **Neogy AB, Vouldoukis I, Costa JM, Monjour L.** Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 1994;54:367-373.
98. **Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E.** Pathological changes in kidneys of dogs with natural leishmania infection. *Vet Parasitol*, 1992;45:33-47.
99. **Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I.** Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999;67:117-130.

100. **Nieto J.** Leishmaniosis canina: riesgo epidemiológico y control. Revista VetMadrid, 2005(marzo-abril):42.

101. **Noli C.** Leishmaniosis canina. Waltham Focus, 1999;9:16-24.

O

102. **Olaussen E, Rekvig OP.** Screening tests for antinuclear antibodies (ANA): selective use of central nuclear antigens as a rational basis for screening by ELISA. J Autoimmun, 1999;13:95-102.

103. **OliveiraAV, Rossi MA, Roque-Barreira MC, Sartori A, Campos-Neto A.** The potential role of Leishmania antigens and immunoglobulins in the pathogenesis of glomerular lesions of hamsters infected with Leishmania donovani. Ann Trop Med Parasitol, 1985;79:539-543.

104. **Ohkouchi K, Mizutani H, Tanaka M, Takahashi M, Nakashima K, Shimizu M.** Anti-elongation factor-1alpha autoantibody in adult atopic dermatitis patients. Int Immunol, 1999;11(10):1635-1640.

P

105. **Palacio J, Liste F, Gascón M.** Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 1997;140:477-480.
106. **Pateraki E, Portocala R, Labrousse H, Guesdon JL.** Antiactin and antitubulin antibodies in canine visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 1983;42:496-500.
107. **Paul S, Wilkerson MJ, Shuman W, Harkin KR.** Development and evaluation of a flow cytometry microsphere assay to detect anti-histone antibody in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005;107:315-325.
108. **Pearson RD, Alencar JE, Romito R, Naidu TG, Young AC, Davis JS.** Circulating immune complexes and rheumtoid factors in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 1983;147:1102.
109. **Pesce AJ, Mendoza N, Boreisha I, Gaizutis MA, Pollak VE.** Use of enzyme linked antibodies to measure serum anti-DNA antibody in systemic lupus erythematosus. *Clin Chem*, 1974;20:353-359.

110. **Peterson ME, Hurvitz AI, Leib MS, Cavanach PG, Dutton RE.** Propylthiouracil-associated hemolytic anemia, thrombocytopenia, and antinuclear antibodies in cats with hyperthyroidism. *J Am Vet Med Assoc*, 1984;184:806-808.
111. **Pinelli E, Boog CJP, Rutten VPMG, Dijk B, Bernadina WE, Ruitenberg EJ.** A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Tissue Antigens*, 1994;43:189-192.
112. **Pinelli E, Rutten VPMG, Labgelaar M, Ruitenberg EJ.** Expression of surface molecules on canine macrophages after in vitro infection with *Leishmania infantum*. *Fourth International Veterinary Immunology Symposium.*, 1995:74.
113. **Pinelli E, Kaaij SY, Slappendel R, Fragio C, Ruitenberger EJ, Bernadina W, Rutten VP.** Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999;69:121-126.
114. **Pinelli E, Rutten VPMG, Bruysters M, Moore PF, Ruitenberg EJ.** Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect Immun*, 1999;67:237-243.

115. **Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A.** Renal involvement in canine leishmaniasis. *Nephron*, 1991;57:444-452.
116. **Portús-Vinyeta M.** Diagnóstico de laboratorio de la leishmaniosis canina. *Canis et Felis*, 1997;29:45-51.
117. **Preston PM.** The immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis of leishmania infections. CRC Press. Boca Raton, 1983; 119-185.
118. **Prud'homme GJ, Parfrey NA.** Biology of disease. Role of T helper lymphocytes in autoimmune diseases. *Laboratory Investigation*, 1988;59:158-172.
119. **Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA.** Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol*, 1989;143:3743-3749.
120. **Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L.** Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol*, 1991;105:279-286.

R

121. **Radic MZ, Weigert M.** Origins of anti-DNA antibodies and their implications for B-cell tolerance. In: Casali P, Silberstein LE eds. Immunoglobulin gene expression in development and disease. Annals of the New York Academy of Science, 1995;704:384-396.

122. **Ramos-Vara JA, Briones V, Segalés J, Vilafranca M, Sordé A, Miller MA.** Concurrent infection with *Streptococcus equisimilis* and leishmania in a dog. J Vet Diagn Invest, 1994;6:371-375.

123. **Remmel T, Piirso A, Koiveer A, Remmel H, Uibo R, Salupere V.** Clinical significance of different antinuclear antibodies patterns in the course of primary biliary cirrhosis. Hepatogastroenterology, 1996; 43(11): 1135-1140.

124. **Reed SG, Shreffler WG, Burns JM, Scott JM, Orge MG, Ghalib HW, Siddig M, Badaro R.** An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, 1990;43:632-639.

125. **Ridley DS, Ridley MJ.** The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. J Pathol, 1983;141:83-96.

126. **Ridley DS, Ridley MJ.** Cutaneous leishmaniasis: immune complex formation and necrosis in the acute phase. *Br J Exp Path*, 1984a;65:327-336.
127. **Ridley DS, Ridley MJ.** Late-stage cutaneous leishmaniasis: immunopathology of tuberculoid lesions in skin and lymph nodes. *Br J Exp Path*, 1984b;65:337-346.
128. **Riera C, Valladares JE, Gallego M, AISA MJ, Castillejo S, Fisa R, Carrió J, Alberola J, Arboix M.** Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol*, 1999;84:33-47.
129. **Rose NR.** Autoimmune diseases. *Sci Anim*, 1981;244:80-84.
130. **Russell G.** The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Clin Biochem*, 1987;164:213-221.

S

131. **Sartori A, Roque-Barreira C, Coe J, Campos-Neto.** Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azarII. Detection and characterization of parasite antigens and antibodies elute

from kidneys of *Leishmania donovani*-infected hamsters. Clin Exp Immunol, 1991;87:386-392.

132. **Semiao-Santos SJ, Elharith A, Ferreira E, Pires CA, Sousa C, Gusmao R.** Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. Parasitol Res, 1995;81:235-239.

133. **Schneider I, Telegdy E, Liszt F.** Study of circulating immune complexes in atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh), 1992;176:65-67.

134. **Schur PH, Monroe M, Rothfield N.** The IgG subclass of antinuclear and antinucleic acid antibodies. Arthritis Rheum, 1972;15:174-182.

135. **Schur PH, Sandson J.** Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. The New Eng J Medicine, 1968;278:535-538.

136. **Shapiro TA, Were JBO, Danso K, Nelson DJ, Desjardins RE, Pamplin CL.** Pharmacokinetics and metabolism of allopurinol riboside Clin Pharmacol Ther, 1991;49:506-514.

137. **Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR.** Mixed connective tissue disease-An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Medicine*, 1972;52:148-159.
138. **Sharp GC, Irving WS, LaRoque RL, Velez C, Daly V, Kaiser AD, Holman HR.** Association of autoantibodies to different nuclear antigens with clinical patterns of rheumatic disease and responsiveness to therapy. *J Clin Invest*, 1971;50:350-359.
139. **Shull RM, Miller HA, Chilina AR.** Investigation of the nature and specificity of antinuclear antibody in dogs. *Am J Vet Res*, 1983;44:2004-2008.
140. **Slappendel RJ, Teske E.** The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet Q*, 1997;19:10-13.
141. **Slappendel RJ.** Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Vet Quaterly*, 1988;10:1-16.
142. **Slappendel RJ, Ferrer L.** Leishmaniasis. En Greene CE ed: *Enfermedades infecciosas en perros y gatos 2ªed.* Mexico DF: McGraw-Hill-Interamericana, 2000; 496-504.

143. **Scott P.** Host and parasite factors regulating the development of CD4+ T-cell subsets in experimental cutaneous leishmaniasis. *Res Immunol*, 1991;142:32-36.
144. **Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portus M.** Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course infection and after treatment. *Vet Parasitol*, 2001;96:265-276.
145. **Solano-Gallego L, Rodríguez A, Razia L, Trotta M, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J.** Detection of *Leishmania* DNA by real-time PCR in urine from dogs with leishmaniasis. Third World Congress of Leishmaniasis, Palermo 10-15 April, 2005; 209.
146. **Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G.** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors* 2011;4:86-102.
147. **Soto M, Requena JM, Quijada L, Pérez MJ, Nieto CG, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C.** Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H

recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, 1996;106:454-461.

148. **Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C.** Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 1998;36:58-63.
149. **Soto M, Requena JM, Quijada L, Pérez MJ, Nieto CG, Guzmán F, Patarroyo ME, Alonso C.** Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, 1999;115:342-349.
150. **Soto M, Alonso C, Requena JM.** The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein LiP2a induces a prominent humoral response in vivo and stimulates cell proliferation in vitro and interferon-gamma production by murine splenocytes. *Clin Exp Immunol*, 2000;122:212-218.
151. **Spangler E, Araujo-Soares RM, Petrillo-Peixoto ML.** Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitol Res*, 1995;81:291-295.
152. **Spreng D.** Leishmanial polyarthritis in two dogs. *J Small Anim Pract*, 1993;34:559-563.

153. **Steinman L.** Autoinmunidad. Investigación y Ciencia, 1993 (Noviembre): 69-77.
154. **Stern JJ, Oca MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW.** Role of L3T4+ and LYT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. J Immunol, 1988;140:3971-3977.
155. **Svec KH, Veit BC.** Age-related factors: immunologic characteristics and associated clinical aspects. Arthritis Rheum, 1967;10:509-516.

T

156. **Tada J, Toi Y, Yoshioka T, Fujiwara H, Arata J.** Antinuclear antibodies in patients with atopic dermatitis and severe facial lesions. Dermatology, 1994;189:38-40.
157. **Tan EM.** Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. Adv Immunol, 1982;33:167-240.
158. **Tan EM.** Antinuclear antibodies in diagnosis and management. Hosp Pract, 1983;(Jan):79-84.

159. **Tan EM.** Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol*, 1988;47:121-141.
160. **Tan EM, Epstein WV.** A solid-phase immunoassay for antibody to DNA and RNA. *J Lab Clin Med*, 1973;81:122-132.
161. **Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG.** Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to Dna in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Investigation*, 1966;45:1732-1740.
162. **Taniguchi Y, Yamakami A, Sakamoto T, Nakamura Y, Okada H, Tanaka H, Mizutani H, Shimizu M.** Positive antinuclear antibody in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)*, 1992;Suppl. 176:62-64.
163. **Tassi P.** Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci*, 1994;56:144-150.
164. **Teodorescu M, Ustiyan V, Russo K, Rubin RL.** Binding to histone of an anomalous IgG from patients with SLE and drug-induced lupus. *Clinical Immunol*, 2004;110:145-153.

165. **Tesouro MA, Rodríguez F, Sáinz A, Jiménez F.** Contribuciones al diagnóstico y patocronia de la leishmaniosis canina (II). *Información Veterinaria*, 1992;(sept.):34-40.
166. **Tesouro MA, Amusátegui I, Mazzucchelli F, Sáinz A, Rodríguez F.** Tratamiento de la leishmaniosis canina. Encuesta epizootiológica en la comunidad de Madrid. *Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios.*, 1995, p45.
167. **Thivolet J, Monier JC, Alain F, Richard MM.** Recherche quantitative simultanée des anticorps antinucléaires totaux et anti acide désoxyribonucléique sur frottis de sang de souris parasitées par *Trypanosoma gambiense*. *Annales d l'Institut Pasteur*, 1965;409:817-830.
168. **Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Kielandr J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowack H, Timpl R.** Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, american cutaneous leishmaniasis and normal individuals recognize termina galactosyl (alfa-1-3)-galactose epitopes. *J Exp Med*, 1987;166:419-432.

169. **Troy GC, Becker MJ, Greene RT.** Proficiency testing of selected antigen and antibody tests for use in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 1996;209:914-917.

U

170. **Ullman B, Carter D.** Molecular and biochemical studies on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases of the pathogenic hemoflagellates. *Int J Parasitol*, 1997;27:203-213.

V

171. **Vaden SL, Pressler BM, Lappin MR, Jensen WA.** Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples. *Vet Clin Pathol*, 2004;33:14-19.
172. **Valladares JE, Alberola J, Esteban M, Arboix M.** Disposition of antimony after administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Rec*, 1996;138:181-183.
173. **Valladares JE, Ruiz de Gopegui R, Riera C, Alberola J, Gállego M, Espada Y, Portús M, Arboix M.** Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in beagle dogs. *Res Vet Sci*, 1998;64:195-198.

174. **Valladares JE, Riera C, González-Ensenyat P, Diez-Cascon A, Ramos G, Solano-Gallego L, Gallego M, Portus M, Arboix M, Alberola J.** Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. *Vet Parasitol*, 2001;97:15-21.
175. **Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M.** Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec*, 2000;146:698-703.
176. **Varela F, Valladares JE.** Respuesta inmunitaria en la leishmaniosis canina. *Canis et Felis*, 1997;29:33-43.
177. **Varela F, Valladares JE.** Poliartritis y leishmaniosis canina: patogenia de la alteración articular. Caso clínico. *Clin Vet Peq Anim*, 1998;18:232-242.
178. **Veress B, Omer A, Satir AA, El-Hassan AM.** Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunol*, 1977;33:605-610.

179. **Vercammen F, Deken R.** Treatment of canine visceral leishmaniasis with allopurinol. *Vet Rec*, 1995;137:252.
180. **Vexenat JA, Olliaro PL, DeCastro JAF, Calvacante R, Campos JHF, Tavares JP, Miles MA.** Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidina (paronomycin). *Am J Trop Med and Hyg*, 1998;58:448-453.
181. **Vidor E, Dereure J, Pratlong F, Dubreuil N, Bissuel G, Moreu Y, Rioux JA.** Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine a *leishmania infantum*. *Prat Med Chir Anim Cie*, 1991;26:133-137.

W

182. **White SD, Rosychuk RAW, Schur PH.** Investigation of antibodies to extractable nuclear antigens in dogs. *Am J Vet Res*, 1992;53:1019-1021.
183. **Wilson MR, Sanders RD.** Immunodiffusion assays for antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and other celular antigens. In Rose NR, Conway E, Fahey JL, Friedman H, Penn

GM. Manual of clinical laboratory immunology, 4th ed., 1992;741-746.

Z

184. **Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, Tapia JA, Durán E, González M, Mañé MC.** SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Res*, 2003;34:137-151.

185. **Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A, Guarraci A.** Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res*, 2003;64:558-561.