

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO EN LA
ESPECIE CANINA: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA
ADMINISTRACIÓN DE DOXICICLINA EN
PERROS SANOS Y CON EHRlichiosis.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Alejandra Villaescusa Fernández

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Ángel Tesouro Díez
Ángel Sainz Rodríguez

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-5901-0

© Alejandra Villaescusa Fernández, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

**EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO EN LA
ESPECIE CANINA.
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE
DOXICICLINA EN PERROS SANOS Y CON
EHRlichiosis**

TESIS DOCTORAL

ALEJANDRA VILLAESCUSA FERNÁNDEZ

Madrid, 2011

D. Miguel Ángel Tesouro Díez, con D.N.I. 5223566-J, Catedrático de Universidad del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, y

D. Ángel Sainz Rodríguez, con D.N.I. 2225544-H, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Evaluación del inmunofenotipo en la especie canina. Estudio del efecto de la administración de doxiciclina en perros sanos y con ehrlichiosis”, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D^a. Alejandra Villaescusa Fernández.

Revisado el presente trabajo, consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

En Madrid, a 15 de diciembre de 2010,

Miguel Ángel Tesouro Díez

Ángel Sainz Rodríguez

*A todos los que me quieren,
por las horas robadas*

*A Aitor,
por tantos motivos...*

AGRADECIMIENTOS

Cuando en mayo de 2006 esta tesis doctoral empezó a tomar forma, parecía muy lejano este momento en el que intentaría agradecer a todos los que me han ayudado en este proceso. Y ahora me encuentro delante del ordenador sin saber por dónde empezar e intentando no emocionarme demasiado... creo que lo más difícil de esta tesis va a ser conseguir resumir en unas pocas líneas lo agradecida que estoy a tanta gente por tantas cosas, porque, al fin y al cabo, no habría sido posible llegar hasta aquí sin el apoyo enorme que he recibido.

Voy a comenzar agradeciendo a mis directores de tesis, Ángel Sainz y Miguel Ángel Tesouro, la oportunidad que me dieron de meter la cabeza en este “mundo de las ehrlichias” que tanto me ha hecho disfrutar. Ángel, gracias por guiarme, ayudarme y, sobre todo, por acompañarme desde hace tantísimo tiempo, cuando aún era una alumna de veterinaria que no sabía qué hacer al acabar la carrera. Gracias, Miguel, porque incluso antes de empezar este trabajo juntos ya estabas ahí, aunque lejos geográficamente, pero siempre dispuesto a echar un cable. Gracias a los dos con toda mi alma.

Fernando, los agradecimientos hacia tí tienen que ir aquí, detrás de los de los directores oficiales, aunque espero que sepas que tu apoyo, consejos y cariño durante estos años han sido para mí tan importantes como si fueses un director más. Gracias por estar siempre ahí.

Y, por supuesto, millones de gracias a las que siempre serán para mí mis compañeras de despacho, aunque haga ya mucho tiempo que no compartimos el “cuartito del torreón”. Merche, no sé qué habría sido de mí sin tu ayuda, sin nuestras conversaciones sobre lo que no es ciencia. Tania, mi compañera de “ehrlichias y demás bichos”, gracias por hacer tan fáciles de llevar los momentos difíciles. Carol, aunque ahora estés tan lejos espero que sepas que para mí eres tan parte de esta tesis como cuando estabas a sólo dos mesas de distancia. Creo que las tres lo sabéis, pero sois mucho más que unas compañeras para mí. Espero poder devolveros todo lo que me habéis dado, aunque habéis puesto el listón muy alto. Gracias.

Violeta, gracias por todo, pero sobre todo por tu apoyo, por tus ánimos y por los cafés compartidos en el trecho final de este trabajo. Alba, gracias por tus ánimos y por ser una alumna de ehrlichias estupenda.

Gracias a los “compañeros de comidas”: Juan Pablo, Isabel, Marigel, Pedro, Luis, Susana, Rafa, Vero... ¡Qué importantes sois en esta tesis a pesar de que los temas de trabajo no se tocan en las comidas!. Gracias de todo corazón.

Tino, cómo podría agradecerte tantas IFIs hechas a contrarreloj pero, sobre todo, tanto cariño. Espero que, al menos, sepas que has sido un grandísimo apoyo para mí. Miki, a ti también te debo todo mi agradecimiento por esas mismas IFIs, pero también por tu apoyo y palabras de ánimo durante todos estos años. Pero, además de a Tino y a Miki, tengo que darle las gracias a otros “habitantes” del laboratorio de Biopatología: Pilar, Eva, Ana y Carmen, gracias por vuestra ayuda siempre que la he necesitado.

Y, por supuesto, gracias a los vecinos de laboratorio: Carmen, Gloria, Susana, Mari Luz, Ernesto... gracias por vuestras sonrisas y ayuda en todo momento.

Gracias, Coro, porque siempre tienes palabras amables para mí y porque has sido una parte importante de esta tesis y de otros proyectos en la recogida de muestras de un número ya incalculable de perros.

No puedo dejar de agradecer a todo el personal del Departamento de Medicina y Cirugía Animal la ayuda prestada, de una forma u otra, durante todo este tiempo, y en especial a Laura y a M^a José.

Este proyecto me ha permitido conocer a gente que de forma totalmente desinteresada me ha enseñado todo lo que ha podido del mundo de la citometría de flujo. Amalia, Carmen, Juanjo: gracias por tantas horas delante del citómetro, por vuestro apoyo inestimable y por siempre recibirme con una sonrisa, a pesar de que os llevase a menudo miles de tubos y de haberos dado tanto trabajo.

Gracias a todo el personal de LAV, especialmente a Gustavo Sánchez Visconti, por vuestras ganas de ayudar.

Quiero agradecer a Santiago Cano su enorme ayuda en la estadística de este trabajo pero, sobre todo, su paciencia y sus palabras de ánimo.

Y, por supuesto, gracias a todos los voluntarios y trabajadores de Perrikus, ANAA y ALBA, a la Unidad de Guías Caninos de la Policía Nacional y a Silvestre, a Miriam Portero y a Ana Peña, y, claro, a Kika, Patricia y Paloma, porque todos vosotros habéis contribuido directamente a que esta tesis llegue hasta aquí.

No quiero olvidarme de los que fueron mis primeros profesores veterinarios externos a la Facultad: miles de gracias, Epi y Fran. No sólo me habéis ayudado antes de comenzar en el mundo investigador, sino que alguno de los perros de esta tesis procede de Los Álamos, lo que demuestra vuestro apoyo constante desde que no era más que un proyecto de veterinaria. Tampoco querría dejar de agradecer a muchos de los compañeros de mi vida profesional como veterinaria clínica de pequeños animales, porque han sido un apoyo insustituible en el desarrollo de esta tesis. Gracias especialmente a Mar, Andrea y Fabi.

Por otra parte, mis compañeros de “vacas” merecen una mención especial, por toda la comprensión que me han ofrecido en este tiempo, apoyándome en mis “dos mundos”. Juan, gracias por tus ánimos y ganas de ayudar siempre durante estos años. Gracias Paco, Miki, Gabriel, Javier, Juanvi, Ito... sois un gran apoyo para mí.

Quisiera continuar agradeciendo el *simplemente* estar ahí siempre a Laura, Marta, Cristina, Claudia, Mireya, Mariana, Lorena, Llanos, Cata, Mónica, Alicia, María, Álvaro, Ruth, Sara, Marina, Kiko, Rafa...

Y gracias también a otra parte de mi vida que también *simplemente* ha estado ahí siempre, apoyándome y dándome todo el cariño: Elisa, Miguel, Abel, Gloria, Paco... Millones de gracias.

Por supuesto tengo que agradecerles a mis padres sus ánimos constantes para superarme, ya que sin ellos, con mi indecisión, no se si me habría atrevido a hacer miles de cosas que me han dado muchas alegrías. Gracias, mamá, por tu cariño, tus consejos, tus ánimos, por escucharme y por ser la mejor madre. Papá, gracias por tu cariño y por enseñarme la diferencia entre los gorriones (mejor dicho pardales) machos y hembras. Sabes que estás detrás de mi vocación veterinaria, la mejor profesión del mundo. Luci, hermana, has escuchado tantas veces mis quejas y mis alegrías y me has animado tantísimas veces que no se cómo decir por escrito lo que siento: ¡gracias!. Y gracias al resto de mi familia, por supuesto, por animarme siempre, pero especialmente a mi tía Vicky, que ya sabe que es mi apoyo. Y entre mi familia espero que sepáis que os estoy incluyendo, Concha, Manolo, Mar y Víctor...

En último lugar quiero darle las gracias a la persona que más ha sufrido con esta tesis: gracias Aitor. A pesar de que se podría decir que esta tesis ha sido tu enemiga, al haberme obligado a abandonarte durante tantísimas horas, siempre me has apoyado, me has animado en los momentos más duros y me has hecho ver que siempre estarás ahí. Sin tu cariño esto habría sido imposible.

¡Gracias!

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALBA	Asociación para la Liberación y Bienestar Animal
ANAA	Asociación Nacional de Amigos de los Animales
APC	Alofococianina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCR	Receptor del antígeno de los linfocitos B
BSA	Albúmina sérica bovina
CAM	Complejo de ataque a membrana
CD	Grupo de diferenciación (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CEA	Comité de Experimentación Animal
CLMF	<i>Cytotoxic lymphocyte maturation factor</i>
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMT	Tetraciclinas modificadas químicamente
COX	Ciclooxigenasa
CR2	Receptor del complemento de tipo 2
DC	Célula dendrítica
EDTA	Tetra-acetato de etilenediamida
ELISA	Prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas
EMC	Ehrlichiosis monocítica canina
FasL	Ligando del receptor de muerte celular Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersión frontal de luz (<i>forward light scatter</i>)
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago
HCVC	Hospital Clínico Veterinario Complutense
HGE	Ehrlichiosis granulocítica humana
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Ioduro de Propidio
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfotoxina
MAPK	Ruta de transducción de señales <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MASP	Proteasas de serina asociadas a MBL
MBL	Lectina de unión a manosa
MBLA	<i>Mouse-specific B lymphocyte antigen</i>

MMP	Metaloproteínasa
MT-MMP	Metaloproteínasa asociada a la membrana
NK	Células “ <i>natural killer</i> ” o linfocitos citolíticos naturales
NKSF	<i>Natural killer cell stimulatory factor</i>
NO	Óxido nítrico
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótido
NOS	Sintasa de óxido nítrico
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDC	Célula dendrítica plasmocitoide
PE	Ficoeritrina
PG	Prostaglandina
PK	Proteína quinasa
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PTX3	Pentraxina larga 3
SP	Surfactante pulmonar
SPD	Enfermedad del salmón (<i>Salmon Poisoning Disease</i>)
SSC	Dispersión lateral de luz (<i>side light scatter</i>)
Tc	Linfocitos T citotóxicos
TCR	Receptor del antígeno de los linfocitos T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocitos T cooperadores (<i>T helper</i>)
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores
UCM	Universidad Complutense de Madrid

ÍNDICE



1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. LA RESPUESTA INMUNITARIA EN LA ESPECIE CANINA	7
2.1.1. INMUNIDAD INNATA	8
2.1.1.1. Componentes de la inmunidad innata.....	9
a. Barreras físicas y químicas:.....	9
b. Componentes celulares de la inmunidad innata.....	9
c. Componentes humorales de la inmunidad innata.....	14
2.1.1.2. Reconocimiento innato de los agentes patógenos	28
2.1.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	31
2.1.2.1. Componentes de la inmunidad adaptativa	33
a. Órganos y tejidos de la inmunidad adaptativa	33
b. Componentes celulares de la inmunidad adaptativa	36
c. Componentes humorales de la inmunidad adaptativa	44
2.1.2.2. Reconocimiento antigénico de la inmunidad adaptativa	48
2.2. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	51
2.2.1. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA	51
2.2.2. FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO	53
2.2.3. COMPONENTES DE LOS CITÓMETROS DE FLUJO.....	56
2.2.4. APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.....	57
2.3. EHRLICHIOSIS CANINA.....	60
2.3.1. INTRODUCCIÓN A LA EHRLICHIOSIS CANINA.....	60
2.3.2. ESPECIES DE LOS GÉNEROS <i>EHRLICHIA</i> , <i>ANAPLASMA</i> Y <i>NEORICKETTSIA</i> QUE AFECTAN A LA ESPECIE CANINA	61
2.3.3. EHRLICHIOSIS MONOCÍTICA CANINA.....	64
2.3.3.1. Patogenia y cuadro clínico de la EMC	65
2.3.3.2. Hallazgos laboratoriales en la EMC	67
2.3.3.3. Diagnóstico de la EMC	68
2.3.3.4. Tratamiento de la EMC	71

2.3.3.5. Prevención de la EMC.....	75
2.3.3.6. La EMC en España.....	76
2.3.3.7. Inmunopatogenia y respuesta inmunitaria en la EMC	77
2.4. LA DOXICICLINA.....	93
2.4.1. EFECTOS EN LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y MECANISMO DE ACCIÓN	95
2.4.2. FARMACOCINÉTICA	95
2.4.3. EFECTOS NO ANTIMICROBIANOS	97
3. OBJETIVOS	103
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
4.1. PLAN DE TRABAJO	111
4.2. ANIMALES	113
4.3. PROTOCOLO DIAGNÓSTICO Y CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES	114
4.3.1. ANAMNESIS.....	114
4.3.2. EXPLORACIÓN FÍSICA	115
4.3.3. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	115
4.3.4. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES.....	116
4.4. ENSAYO CLÍNICO: ADMINISTRACIÓN DE DOXICICLINA	118
4.4.1. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO CON DOXICICLINA.....	118
4.4.2. PLANIFICACIÓN DE LOS CONTROLES.....	119
4.5. TÉCNICAS LABORATORIALES EMPLEADAS	120
4.5.1. HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA.....	120

4.5.2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	122
4.5.2.1. Antígenos empleados.....	122
4.5.2.2. Técnica	123
4.5.2.3. Puntos de corte	125
4.5.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	126
4.5.3.1. Extracción de ADN	126
4.5.3.2. Control de la extracción de ADN	126
4.5.3.3. Cuantificación y valoración de la calidad del ADN	127
4.5.3.4. Procesamiento de las muestras mediante PCR.....	127
4.5.4. CITOMETRÍA DE FLUJO	130
4.5.4.1. Anticuerpos monoclonales empleados	130
4.5.4.2. Procesado de las muestras	131
4.5.4.3. Análisis de los datos e inmunofenotipaje	133
4.5.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CITOCINAS MEDIANTE ELISA.....	138
4.5.5.1. Protocolo de procesado de las muestras	138
4.5.5.2. Lectura de la absorbancia	140
4.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	141
5. RESULTADOS.....	145
5.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES.....	147
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS	151
5.2.1. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS.....	151
5.2.1.1. Distribución en función del sexo.....	151
5.2.1.2. Distribución en función de la edad.....	152
5.2.1.3. Distribución en función de la raza.....	153
5.2.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS.....	153
5.2.2.1. Analítica sanguínea básica y proteinograma	153
5.2.2.2. Inmunofenotipo	156

5.2.2.3. Concentración plasmática de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10	157
5.2.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA EDAD, EL SEXO Y LA RAZA SOBRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS.....	158
5.2.3.1. Sexo.....	158
5.2.3.2. Edad.....	158
5.2.3.3. Raza.....	165

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON EMC 170

5.3.1. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON EMC	170
5.3.1.1. Distribución en función del sexo.....	170
5.3.1.2. Distribución en función de la edad.....	171
5.3.1.3. Distribución en función de la raza.....	171
5.3.1.4. Distribución en función de la fase de la EMC	172
5.3.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON EMC	173
5.3.2.1. Analítica sanguínea básica y proteinograma.....	173
5.3.2.2. Inmunofenotipo	176
5.3.2.3. Concentración plasmática de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α	177
5.3.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA FASE DE LA EMC SOBRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LA POBLACIÓN DE PERROS CON EMC....	177

5.4. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE PERROS SIN EMC Y CON DIFERENTES PATOLOGÍAS..... 182

5.4.1. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS SIN EMC PERO CON OTRAS PATOLOGÍAS	182
5.4.1.1. Distribución en función del tipo de patología	182
5.4.1.2. Distribución en función del sexo.....	184
5.4.1.3. Distribución en función de la edad.....	184
5.4.1.4. Distribución en función de la raza.....	185
5.4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE PERROS SIN EMC PERO CON OTRAS PATOLOGÍAS.....	186

5.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS ENTRE LAS POBLACIONES DE PERROS SANOS, CON EMC Y CON OTRAS PATOLOGÍAS 187

5.6. ENSAYO CLÍNICO: EVOLUCIÓN DE LAS VARIABLES ANALIZADAS A LO LARGO DEL TIEMPO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE DOXICICLINA EN PERROS SANOS Y EN PERROS CON EMC 201

5.6.1. EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL ERITROGRAMA E ÍNDICES ERITROCITARIOS 202

5.6.2. EVOLUCIÓN DEL RECUENTO PLAQUETARIO A LO LARGO DEL TIEMPO 209

5.6.3. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LOS RECUENTOS LEUCOCITARIOS 210

5.6.4. EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA BÁSICA 218

5.6.5. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LOS PARÁMETROS DEL PROTEINOGRAMA 222

5.6.6. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DEL INMUNOFENOTIPO 233

5.6.7. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE IFN- γ , IL-6, IL-10 Y TNF- α 244

6. DISCUSIÓN.....249

6.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS 251

6.1.1. DATOS ANALÍTICOS DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS..... 251

6.1.1.1. Analítica sanguínea 251

6.1.1.2. Inmunofenotipo 252

6.1.1.3. Concentración plasmática de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α 257

6.1.2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL SEXO, LA EDAD Y LA RAZA SOBRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS 261

6.1.2.1. Sexo 261

6.1.2.2. Edad 261

6.1.2.3. Raza 266

6.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS ENTRE LAS POBLACIONES DE PERROS SANOS, CON EMC Y CON OTRAS PATOLOGÍAS 271

6.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS ENTRE LOS PERROS CON EMC EN FASE SUBCLÍNICA Y LOS PERROS CON EMC EN FASE CLÍNICA.....	276
6.4. ENSAYO CLÍNICO: EVOLUCIÓN DE LAS VARIABLES ANALIZADAS A LO LARGO DEL TIEMPO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE DOXICICLINA EN PERROS SANOS Y EN PERROS CON EMC.....	279
7. CONCLUSIONES	289
8. RESUMEN	295
9. SUMMARY	299
10. BIBLIOGRAFÍA	303

1. INTRODUCCIÓN



La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad de transmisión vectorial causada por *Ehrlichia canis*, bacteria gramnegativa intracelular obligada con tropismo por monocitos y macrófagos. A pesar de que la primera descripción de la infección por *E. canis* en el perro se remonta a 1935, los conocimientos actuales sobre la respuesta inmunitaria y la inmunopatogenia en el curso de la enfermedad en el perro son escasos. Diversos investigadores han sugerido que la respuesta inmunitaria desarrollada en la EMC no sólo es ineficaz, sino que puede contribuir de forma decisiva en el cuadro clínico, la sintomatología y los hallazgos laboratoriales y anatomopatológicos de los perros afectados.

La doxiciclina es uno de los fármacos más empleados en el tratamiento de esta patología, así como en las enfermedades causadas, tanto en el perro como en otros animales y en el hombre, por otras especies bacterianas de la familia Anaplasmataceae, a la que pertenece *E. canis*. Se trata de una tetraciclina semisintética ampliamente prescrita por sus conocidas propiedades antimicrobianas basadas en la inhibición de la síntesis proteica en los microorganismos sensibles. Sin embargo, este fármaco cada vez recibe más atención por otra serie de propiedades independientes de su actividad antimicrobiana: se ha descrito que la doxiciclina, al igual que otras tetraciclinas, puede ejercer una serie de efectos inmunomoduladores y/o antiinflamatorios, asociados con efectos sobre la proliferación y actividad de los linfocitos sanguíneos, inhibición de la síntesis de algunas citocinas e inhibición de la actividad de determinadas metaloproteinasas. Estos efectos han promovido el que en la actualidad existan numerosos estudios clínicos en marcha evaluando su posible empleo en patologías tan dispares como la artritis reumatoide, periodontitis, patologías dermatológicas de base inmunomediada o, incluso, en ciertas patologías oncológicas. Algunos autores han sugerido que la respuesta al tratamiento con doxiciclina en algunas patologías infecciosas podría asociarse no sólo a su efecto antimicrobiano, sino también a sus efectos directos sobre el sistema inmunitario, que podrían favorecer la eliminación del agente y evitar el desarrollo de lesiones o alteraciones inmunomediadas, como las que suelen asociarse con la EMC.

Los estudios existentes hasta el momento para tratar de esclarecer tanto la respuesta inmunitaria y la inmunopatogenia de la infección por *Ehrlichia* spp. como el efecto de la doxiciclina sobre el sistema inmunitario se han llevado a cabo principalmente *in vitro* o en modelos murinos. A su vez, los conocimientos disponibles sobre las subpoblaciones linfocitarias en la especie canina, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, son

muy limitados. Todo ello ha conducido a que en esta tesis doctoral se haya intentado profundizar en el conocimiento de la respuesta inmunitaria en perros con infección natural por *E. canis*, principalmente basándonos en el inmunofenotipo y la secreción de citocinas. Asimismo, se ha evaluado el efecto que sobre el sistema inmunitario ejerce la doxiciclina tanto en los perros sanos como en los perros con EMC.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. LA RESPUESTA INMUNITARIA EN LA ESPECIE CANINA

El sistema inmunitario es uno de los componentes más complejos del organismo y es el encargado de la protección de los animales frente a la invasión microbiana y otras agresiones, por lo que resulta esencial para la vida.

La protección del organismo viene dada por un sistema complejo de mecanismos de defensa que se interrelacionan para conseguir de forma conjunta la destrucción o control del agente patógeno. El fallo de estas defensas, tanto porque el sistema inmunitario se encuentre dañado como porque el agente patógeno sea capaz de evadir las defensas del hospedador, dará como resultado la enfermedad e, incluso, la muerte del animal afectado (Tizard 2009h).

Tradicionalmente se ha dividido el sistema inmunitario en dos componentes (innato y adaptativo), con diferentes funciones y papeles en la defensa del hospedador y que constan de lo que podríamos denominar un brazo aferente (o sensitivo) y un brazo eferente (o efector). El brazo aferente se encargará de la forma en la que los organismos multicelulares son capaces de percibir la infección, mientras que el brazo eferente será el encargado de tratar de erradicar dicha infección. Ambos brazos constan a su vez de un componente humoral y otro componente celular (Beutler 2004).

A pesar de la división descrita entre inmunidad innata y adaptativa, ambos componentes del sistema inmunitario se relacionan entre sí, de forma que, en muchas ocasiones, puede ser difícil determinar dónde terminan las labores de la inmunidad innata y dónde comienzan las de la inmunidad adaptativa (Beutler 2004).

Una vez hecha esta apreciación, con el fin de facilitar la comprensión de los mecanismos implicados en la respuesta inmunitaria en los organismos superiores, haremos en esta revisión bibliográfica la división clásica de los componentes innato y adaptativo, para centrarnos, a continuación, en la respuesta inmunitaria que se genera en la especie canina frente a la invasión rickettsial por especies del género *Ehrlichia*.

2.1.1. INMUNIDAD INNATA

Todos los seres vivos, para garantizar su supervivencia, deben poseer alguna forma de defensa frente a los organismos que puedan causarles algún tipo de daño que les lleve a contraer enfermedad o, incluso, a la muerte. Tanto los invertebrados como los vertebrados poseen defensas inmunitarias innatas y, sin embargo, el sistema inmunitario adquirido evolucionó únicamente después de la aparición de los peces provistos de mandíbula, de forma que sólo los vertebrados superiores poseen ambas formas de inmunidad, innata y adaptativa (Tizard 2009j).

La inmunidad innata, que también se denomina inmunidad natural o espontánea, aporta la primera línea de defensa frente a los microorganismos y consiste en un conjunto de mecanismos celulares y bioquímicos de protección existentes ya de forma previa al encuentro con los patógenos y que son capaces de activarse con rapidez una vez producida la infección. Estos mecanismos sólo se instauran frente a los patógenos y los derivados de las células dañadas y responden siempre de la misma manera, al carecer de la llamada “memoria inmunitaria” (Abbas et al. 2008g, Tizard 2009h).

Esta función de la inmunidad innata de ofrecer la primera respuesta frente a los microorganismos de forma rápida no es su única labor, sino que también estimula las respuestas adaptativas, de forma que estas respuestas adaptativas únicamente se activarán tras haberse producido el reconocimiento inmunitario innato. Es necesario, por tanto, que exista una comunicación entre ambos sistemas (Janeway & Medzhitov 1998, Medzhitov & Janeway 1998, Medzhitov & Janeway 2000, Saalmuller 2006, Abbas et al. 2008g).

A continuación vamos a pasar a hacer una revisión de los componentes celulares y humorales que participan en las respuestas inmunitarias innatas y de los mecanismos de reconocimiento inmunitarios implicados en estas respuestas. En muchas ocasiones será inevitable hacer referencia a las funciones o relaciones existentes con las respuestas adaptativas, debido a la interconexión existente ya descrita.

2.1.1.1. Componentes de la inmunidad innata

Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes:

a. Barreras físicas y químicas: las defensas más efectivas del organismo serán aquellas que impidan la entrada de los patógenos. No todos los autores consideran que estas barreras pertenezcan al sistema inmunitario (Tizard 2009h), pero tradicionalmente han sido incluidas como un componente más de la inmunidad innata (Abbas et al. 2008g).

La separación física entre el medio externo y el hospedador es llevada a cabo principalmente por tres superficies: la piel y las superficies mucosas del aparato digestivo y del aparato respiratorio. Estas superficies están constituidas por un epitelio continuo que forma una barrera física que impide el paso de los microorganismos. Si estos epitelios resultan dañados, habrá una predisposición al desarrollo de infecciones (Abbas et al. 2008g, Tizard 2009h).

Por otra parte, no debemos olvidar la existencia de otras defensas físicas incluidas en los denominados procesos de “auto-limpieza”, como la tos, el estornudo o el flujo mucoso en el aparato respiratorio, el vómito y la diarrea en el aparato digestivo o el propio flujo urinario en el aparato urinario (Tizard 2009h).

Además, los epitelios son capaces de producir péptidos que poseen propiedades antimicrobianas y que describiremos con más detalle en el apartado de los componentes humorales de la inmunidad innata.

b. Componentes celulares de la inmunidad innata: los componentes celulares más importantes del sistema inmunitario innato proceden de las células madre de la médula ósea. Incluyen células de la estirpe mielocítica, como los neutrófilos, los fagocitos mononucleares, las células dendríticas y los mastocitos, y células de la estirpe linfocítica, como los linfocitos citolíticos naturales (o células “natural killer”, NK), los linfocitos T $\gamma\delta$ y los linfocitos B B-1 (Beutler 2004, Abbas et al. 2008g).

Dos tipos de estos leucocitos se han especializado en la fagocitosis de los microorganismos invasores y nacen a partir de una estirpe común de células de la médula ósea: son los neutrófilos y los macrófagos, y comenzaremos por la descripción de sus características en esta revisión de los componentes celulares implicados en la inmunidad innata.

- *Neutrófilos*: los neutrófilos también se denominan “fagocitos polimorfonucleares” o “granulocitos polimorfonucleares neutrófilos” y representan la población más abundante de leucocitos circulantes en muchas especies de mamíferos, incluido el perro. Son células esféricas, de unos 12 a 15 μm de diámetro y presentan un núcleo segmentado en unos tres a cinco lobulillos conectados entre sí. En su citoplasma podemos encontrar granulaciones que contienen enzimas (lisozima, colagenasa, elastasa...) y otras sustancias de actividad microbicida (como defensinas y catelicidinas). En la sangre existe una población de neutrófilos circulantes y otra población de neutrófilos que se hallan secuestrados en los capilares. Durante la infección bacteriana, el número de neutrófilos circulantes aumentará de forma llamativa. Estas células intervienen en las primeras fases de las respuestas inflamatorias, de forma muy rápida, pero son células de vida muy corta, sobreviviendo únicamente 6 horas, tras las cuales entran en el proceso de apoptosis (Beutler 2004, Abbas et al. 2008g, Tizard 2009q). Una vez que los neutrófilos alcanzan el lugar de la infección, comienza el proceso de fagocitosis y destrucción de las partículas extrañas mediante una combinación de procesos oxidativos y procesos enzimáticos (Smith 1994, Tizard 2009q). Por otra parte, estas células son capaces de sintetizar y secretar mediadores humorales, como ciertas citocinas, que pueden jugar un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias (Smith 1994).
- *Fagocitos mononucleares*: el *sistema mononuclear fagocitario* o *sistema monocito-macrofágico* está constituido por células que se forman a partir de células madre de la médula ósea denominadas monoblastos (Tizard 2009l). Los componentes de este sistema presentan como función principal la fagocitosis y ocupan un lugar central en la inmunidad innata y adaptativa. El primer tipo celular de este sistema que abandona la médula ósea para entrar en el torrente sanguíneo es el monocito, que permanece en sangre durante unos tres días (Abbas et al. 2008g, Tizard 2009l). Se trata de células de unos 10-15 μm con un núcleo simple y un abundante citoplasma granular fino que contiene lisosomas y vacuolas fagocíticas (Abbas et al. 2008g, Tizard 2009l). Una vez que han penetrado en los tejidos, se produce su maduración para dar lugar a los macrófagos, células que presentan una morfología variable en función de los estímulos a los que estén sometidos y que han recibido diferentes nombres según su localización en el organismo (células de Kupffer en el hígado, osteoclastos en el hueso, microgliocitos en el sistema nervioso central, etc.). Una vez que los macrófagos resultan activados se inician sus funciones efectoras casi a tanta velocidad como ocurre con los neutrófilos. Sin embargo, estas células, a diferencia de lo que ocurre con los neutrófilos, no se han diferenciado por completo, por lo que pueden sufrir una división celular en el foco inflamatorio, lo que, unido al hecho de que poseen una vida media mucho mayor, hace que sean las células efectoras dominantes durante las últimas

etapas de la respuesta inmunitaria innata, 1-2 días después de la infección (Abbas et al 2008g). Además, los macrófagos son células centinela importantísimas, junto con las células dendríticas y los mastocitos, y son capaces de secretar citocinas proinflamatorias que promueven respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas.

Además de estos leucocitos polimorfonucleares y mononucleares que se han especializado en la fagocitosis, existen otras células procedentes de la estirpe mielocítica que participan en la respuesta inmunitaria innata y que describiremos a continuación:

- *Células dendríticas (DC)*: las células dendríticas constituyen una población heterogénea de células que pueden ser halladas en prácticamente cualquier tejido del organismo, a excepción del cerebro, algunas partes del globo ocular y los testículos. Son especialmente numerosas en los nódulos linfáticos, la piel y superficies mucosas, localizaciones donde con mayor frecuencia podrán encontrarse patógenos. Las células dendríticas poseen tres funciones principales: en primer lugar, sirven como células centinela, junto con los macrófagos y, por tanto, activan las respuestas inmunitarias innatas. En segundo lugar, se encargan del procesamiento de los antígenos, al tratarse de las células presentadoras de antígeno más importantes del organismo. Finalmente, gracias a sus funciones previamente descritas, son capaces de regular ambas formas de inmunidad (Tizard 2009i), constituyendo un importante puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las células dendríticas son las únicas células presentadoras de antígeno capaces de activar los linfocitos T vírgenes, es decir, aquellos que no han entrado aún en contacto con el antígeno (Abbas et al. 2008g, Tizard 2009i). Además, son capaces de ejercer efectos citotóxicos directos (Chauvin & Josien 2008, Tizard 2009i). Las células dendríticas poseen una morfología variable, dependiendo principalmente de su estado de activación o maduración, y son capaces de migrar al sitio donde hay inflamación, para atrapar y procesar el posible antígeno y los restos celulares, y transportarlos a continuación a los tejidos linfoides para poder llevarse a cabo la presentación antigénica (Banchereau et al. 2000, Tizard 2009i). Esta migración dendrítica se acompaña de una maduración y diferenciación hacia células dendríticas maduras que conduce a una mayor expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), moléculas de adhesión celular (CD54, CD58) y moléculas coestimuladoras involucradas en la activación de los componentes celulares del sistema inmunitario adaptativo (CD80, CD86), entre otras. Tras esta maduración, las células dendríticas son ya capaces de interactuar en los nódulos linfáticos con los linfocitos T vírgenes (Saalmuller 2006).

- *Mastocitos*: estas células forman parte de las denominadas células centinela, al igual que los macrófagos y las células dendríticas, y se originan a partir de células madre de la médula ósea (Tizard 2009). Son células grandes, de unos 15 a 20 μm , redondeadas, con el citoplasma densamente empaquetado con gránulos grandes (lisosomas secretores). El precursor de los mastocitos migra hacia los tejidos, donde se produce su maduración y sobrevive durante varias semanas o meses. Los mastocitos se localizan en diferentes tejidos conectivos del organismo, bajo las superficies mucosas, en la piel y rodeando los nervios, pero en donde encontraremos un mayor número de estas células es en las zonas del organismo en las que exista una mayor exposición a posibles agentes patógenos, es decir, en la piel y en los aparatos digestivo y respiratorio. En estas localizaciones se disponen cerca de los vasos sanguíneos, donde, mediante la liberación de ciertas moléculas que contienen sus gránulos, pueden regular el flujo sanguíneo e influyen en la migración celular, jugando así un papel central en la inmunidad innata y, más concretamente, en la inflamación aguda (Tizard 2009).

Como se ha comentado al comienzo de este apartado, dentro de los componentes celulares implicados en las respuestas inmunitarias innatas se incluyen no sólo células de la estirpe mielocítica, sino también células pertenecientes a la estirpe linfocítica, entre las que destacan:

- *Linfocitos citolíticos naturales o linfocitos NK*: estas células pertenecen a una población de linfocitos que contribuyen a las respuestas protectoras innatas frente a una gran variedad de agentes infecciosos y células tumorales gracias a su habilidad para producir la destrucción directa de las células diana y ser, además, una fuente temprana de citocinas inmunorreguladoras (Trinchieri 1989, Abbas et al. 2008g). Probablemente comparten precursores en la médula ósea con los linfocitos T, pero, a diferencia de éstos, los linfocitos citolíticos naturales no dependen de un procesamiento en el timo para su total desarrollo (Tizard 2009s). Pueden encontrarse en sangre periférica y en diferentes tejidos, como médula ósea, bazo, nódulos linfáticos, hígado, pulmón, omento, intestino y placenta (Vivier 2006). Las células NK en la mayoría de los mamíferos son linfocitos grandes, granulares y sin actividad fagocítica, y se ha estimado que aproximadamente el 5-15% del total de los linfocitos que se hallan en sangre circulante pertenecen a esta población (Tizard 2009s). Prácticamente todos los linfocitos citolíticos naturales presentes en sangre periférica contienen gránulos citoplasmáticos con perforina, una proteína con potente actividad citolítica por su habilidad para formar poros en la membrana celular (Abbas et al. 2008g, Tizard 2009s). En base a sus marcadores de superficie, no son ni linfocitos T ni B (Glimcher et al. 1977, Abbas et al. 2008g, Tizard 2009s) y no expresan receptores del antígeno de

distribución clonal sometidos a un reordenamiento somático (Abbas et al. 2008g). De hecho, no utilizan receptores antígeno-específicos como hacen el resto de linfocitos, sino que emplean diferentes combinaciones de receptores de reconocimiento de lesión inhibidores y activadores para unirse a las células (Tizard 2009s). Tradicionalmente han sido descritos como una población de células efectoras citotóxicas cuya rápida respuesta frente a las células infectadas o lesionadas sin necesidad de un contacto previo hace que participen en la primera línea de defensa inmunitaria, anterior a la activación de las respuestas adaptativas frente a la infección y el desarrollo tumoral (Trinchieri 1989). Pero, además, se ha comprobado que los linfocitos NK interaccionan con diferentes componentes celulares, principalmente con células presentadoras de antígeno y linfocitos T y B, siendo capaces de este modo de ejercer funciones reguladoras de la inmunidad innata y adaptativa (Lunemann et al. 2009). Por otra parte, es importante tener en cuenta que no se trata de una población celular homogénea, sino que en ella se incluye una serie de subpoblaciones con diferentes funciones, localizaciones y orígenes. En el hombre, las células NK en sangre periférica pueden ser divididas según su expresión de los marcadores de superficie CD56 y CD16 en, al menos, dos subpoblaciones funcionalmente diferentes. Las células NK CD56dim CD16+ constituyen aproximadamente el 90% del total de los linfocitos NK en sangre periférica y responden al reconocimiento de células infectadas o dañadas principalmente mediante su destrucción directa (Lanier et al. 1986, Lunemann et al. 2009), siendo su producción de citocinas baja (Cooper et al. 2001), por lo que podríamos hablar de ellas como las verdaderas células NK “citólíticas”. En cambio, las células NK CD56bright CD16- constituyen menos del 10% del total de las células NK en sangre periférica, siendo más abundantes en los órganos linfoides secundarios (Ferlazzo et al. 2004) y, una vez activadas, producen abundantes citocinas (Cooper et al. 2001), adquiriendo citotoxicidad únicamente tras una prolongada activación (Ferlazzo et al. 2004). Además, se ha descrito otra población de linfocitos citolíticos naturales que comparten propiedades tanto de los linfocitos NK como de los linfocitos T: son las células NK T. Son producidas en el timo pero su especificidad se centra en algunos patrones moleculares asociados a patógenos, característico de la inmunidad innata, como veremos más adelante. Sirven de unión entre las células T y el sistema innato de las células NK y juegan un papel importante en determinadas alergias, inmunidad antitumoral, autoinmunidad e inmunidad antimicrobiana (Tizard 2009s).

- *Linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos B B-1*: las barreras epiteliales y las cavidades serosas contienen ciertos tipos de linfocitos (como los linfocitos T $\gamma\delta$ y los linfocitos B B-1, respectivamente) que reconocen a los microorganismos de contacto más habitual y responden frente a ellos. Como veremos más adelante en esta revisión bibliográfica, la mayor parte de los linfocitos T y B, participan en las respuestas inmunitarias

adaptativas y reconocen a las células diana gracias a unos receptores antigénicos exclusivos de cada clon de linfocitos que se generan mediante recombinación somática entre los segmentos de ADN de la línea germinal. En cambio, los linfocitos T $\gamma\delta$ y los linfocitos B B-1 presentes en las cavidades serosas reconocen estructuras que se expresan de forma habitual en muchas especies de patógenos, presentando, por tanto, una diversidad mucho más escasa. Estos linfocitos responderán de forma similar a como lo hacen otras células de la inmunidad innata frente a una gran variedad de agentes invasores, bien mediante la secreción de citocinas, activación de fagocitos y destrucción de las células infectadas, en el caso de los linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales, o bien mediante la producción de anticuerpos constituidos por inmunoglobulina M, en el caso de los linfocitos B-1 (Abbas et al. 2008g).

c. Componentes humorales de la inmunidad innata: en el plasma y en los líquidos extracelulares podemos encontrar diferentes proteínas que, por una parte, ejercen funciones de reconocimiento de las células diana y, por otra parte, sirven como elementos efectores de la respuesta inmunitaria innata. Los principales componentes de esta rama humoral de la inmunidad innata son: el sistema del complemento, pentraxinas, colectinas, ficolinas, lisocima, lactoferrina, péptidos antimicrobianos y determinadas citocinas (Beutler 2004, Abbas et al. 2008g).

➤ *Sistema del complemento*: el sistema del complemento fue descrito por primera vez en 1901 por Jules Bordet y Octave Gengou (Bordet & Gengou 1901) gracias a una serie de ensayos que fueron realizados con el fin de estudiar la capacidad antibacteriana de la sangre humana. En estos experimentos se descubrió la existencia de dos fracciones en el suero sanguíneo normal en función de su estabilidad a altas temperaturas: una fracción termolábil y otra fracción termoestable. La primera de estas fracciones es la que posteriormente fue denominada “complemento”, en referencia a su actividad “complementaria” a la función antibacteriana ejercida por la fracción termoestable. Estos investigadores observaron que la fracción termolábil, el complemento, era necesaria para la opsonización de las bacterias pero, además, era capaz de destruir algunos microorganismos de forma directa. Hoy en día se sabe que el complemento es un sistema altamente complejo consistente en más de 30 proteínas séricas y de superficie celular que interactúan entre sí y con otras moléculas del sistema inmunitario y que está íntimamente involucrado no sólo en las respuestas inmunitarias innatas, sino también en la regulación de la inmunidad mediada por células B y T (Carroll 2004a, Abbas et al. 2008i). En condiciones normales, las proteínas del complemento se encuentran en su forma inactiva y, únicamente cuando son activadas por determinados estímulos, dan lugar a la formación de diferentes productos que ejercen las funciones efectoras del complemento que veremos a continuación. Esta

activación puede llevarse a cabo por, al menos, tres vías que se han denominado clásica, alternativa y de la lectina. Las vías alternativa y de la lectina son mecanismos efectores de la inmunidad innata, mientras que la vía clásica es un mecanismo de la inmunidad adaptativa, ya que depende de la unión antígeno-anticuerpo. Sea cual sea la vía implicada en la activación del sistema del complemento, ésta se produce por medio de una cascada enzimática que da como resultado la generación de enzimas con actividad proteolítica, entre las que cabe destacar los complejos denominados C3-convertasa y C5-convertasa que son proteínas clave encargadas de la escisión de la proteína C3 en los fragmentos denominados C3a y C3b y la proteína C5 en los fragmentos C5a y C5b, respectivamente, que poseen diferentes funciones biológicas (Abbas et al. 2008i). Precisamente uno de estos fragmentos proteolíticos constituye el componente central del complemento y la mayor opsonina del organismo, y en él convergen las tres vías de activación de este sistema: es el fragmento proteico C3b, formado a partir de la escisión de C3 (Frieck & Kemper 2009).

Las funciones biológicas de la activación del sistema del complemento por cualquiera de estas rutas incluyen la opsonización y fagocitosis de los agentes patógenos, la estimulación de las respuestas inflamatorias y la citólisis directa mediada por el complemento (Beutler 2004, Abbas et al. 2008i, Tizard 2009g). Los fragmentos proteicos C3b y C4b, formados tras la activación del complemento, son capaces de unirse mediante enlaces covalentes a las superficies de las células sobre las que se ha activado el complemento y, mediante su posterior unión a receptores específicos de los macrófagos y los neutrófilos, conducir a su fagocitosis. Esta fagocitosis de los microorganismos dependiente de C3b y C4b es un mecanismo de defensa importante frente a las infecciones tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Por otra parte, los fragmentos proteolíticos C5a, C4a y C3a son lo que se denomina “anafilatoxinas”. Estas moléculas son potentes agentes quimiotácticos y son capaces de inducir una reacción inflamatoria aguda mediante el reclutamiento de células efectoras del sistema inmunitario al lugar donde se ha producido la activación del complemento, a la vez que generan la activación y degranulación de los mastocitos y otras células inmunitarias (Beutler 2004, Abbas et al. 2008i). Además de los efectos descritos, la activación del complemento puede conducir a la lisis directa de los microorganismos en un mecanismo mediado por el “complejo de ataque a membrana” (o CAM), anillo formado por subunidades proteicas generadas en los pasos finales de la activación del complemento. En concreto se trata del complejo C5b6789, que se inserta dentro de la doble cadena lipídica de dicha membrana para dar lugar a la formación de poros que actúan como canales que permiten el movimiento libre de agua e iones, provocando un desequilibrio osmótico y la rotura de las células en cuya superficie se ha depositado (Abbas et al. 2008i). Por otra parte, hay que recordar que el sistema del complemento

ejerce funciones reguladoras de la inmunidad, en parte mediada por el hecho de que algunos de sus productos son capaces de actuar como señales secundarias para la activación de los linfocitos B y la síntesis de anticuerpos, iniciándose de este modo respuestas inmunitarias humorales propias de la inmunidad adaptativa (Carroll 2004a, Abbas et al. 2008i). Asimismo, se ha observado que el complemento modula las respuestas mediadas por células T, afectando tanto a la activación de dichas células como a sus funciones efectoras (Carroll 2004b).

➤ *Pentraxinas*: se trata de un grupo de proteínas pentaméricas plasmáticas muy antiguas desde el punto de vista evolutivo que se encargan del reconocimiento microbiano y participan en la inmunidad innata. Entre ellas destacan la *proteína C reactiva*, el *amiloide sérico P* y la pentraxina larga *PTX3*. Las dos primeras en ocasiones son denominadas “reactantes de fase aguda”, ya que su síntesis aumenta en respuesta a las interleucinas (IL) 1 y 6 que son producidas por los fagocitos en las respuestas inmunitarias innatas. Estas proteínas reconocen ligandos moleculares observados en las membranas de los agentes patógenos y en las células que se encuentran en proceso de apoptosis, pero no en las células sanas del hospedador. Pueden actuar como opsoninas y activar o interactuar con el sistema del complemento para ejercer sus funciones. La *PTX3* no pertenece al grupo de los reactantes de fase aguda. Es producida por diferentes tipos celulares (principalmente células dendríticas, células endoteliales y macrófagos) en respuesta a TNF (Abbas et al. 2008g).

➤ *Colectinas*: se trata de una familia de proteínas que presentan un dominio de estructura similar al colágeno y otro dominio de lectina de tipo C. En este grupo de proteínas se incluyen tres que funcionan como moléculas solubles para el reconocimiento de patrones en la inmunidad innata: la lectina de unión a manosa (MBL) y las proteínas del surfactante pulmonar SP-A y SP-D. La lectina de unión a manosa es una proteína plasmática que es sintetizada en el hígado y se libera en las respuestas agudas. Se une a los carbohidratos de las membranas de bacterias grampositivas y gramnegativas, así como a algunos virus y parásitos, y puede activar el sistema del complemento (Medzhitov & Janeway 2000, Abbas et al. 2008g).

➤ *Ficolinas*: las ficolinas son unas proteínas plasmáticas con características estructurales parecidas a las de las colectinas, ya que poseen un dominio similar al colágeno pero, en lugar de un dominio de lectina de tipo C, poseen un dominio de tipo fibrinógeno para el reconocimiento de hidratos de carbono. Participan en las respuestas inmunitarias innatas mediante su unión a diferentes especies bacterianas, su opsonización y estimulación del sistema del complemento de forma similar a como lo hace la lectina de unión a manosa (Abbas et al. 2008g).

- *Lisocima*: Es una proteína presente en diferentes fluidos corporales capaz de destruir las paredes de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas por medio de un mecanismo enzimático (Beutler 2004).
- *Lactoferrina*: se trata de una proteína capaz de alterar la motilidad de las bacterias y su habilidad para formar biopelículas, así como ayudar a su eliminación (Singh et al. 2002).
- *Péptidos antimicrobianos*: como se comentó en el apartado de barreras físicas implicadas en la inmunidad innata, los epitelios son capaces de producir péptidos que poseen propiedades antimicrobianas y que pertenecen a varias familias, entre las que cabe destacar las defensinas y las catelicidinas (Abbas et al. 2008g, Tizard 2009q). Aunque son estructuralmente diversas, estas familias peptídicas comparten una serie de características: poseen una carga neta catiónica debido a la presencia de múltiples residuos de arginina y lisina y son capaces de formar estructuras anfipáticas, al insertarse sus regiones hidrofóbicas en la membrana lipídica bacteriana, quedando las regiones hidrofílicas cubriendo la membrana o formando, incluso, canales iónicos, que dan como resultado una interrupción en la membrana y la muerte microbiana (Tizard 2009q).
 - Defensinas: son unos pequeños péptidos catiónicos que contienen tres o cuatro puentes disulfuro dentro de su cadena y que poseen una longitud de 28 a 42 aminoácidos. En los mamíferos se han identificado más de 50 defensinas, que se clasifican en función de su origen y de la localización de los puentes disulfuro en tres familias: α , β y θ . Estas últimas sólo pueden encontrarse en los neutrófilos de primates. Las defensinas pueden producirse tanto de forma constitutiva como en respuesta a la infección por microorganismos. Son producidas en los epitelios de las mucosas y en ciertos tipos de leucocitos que contienen gránulos, son capaces de ejercer actividades microbicidas directas sobre bacterias, hongos y algunos tipos de virus y participan en la defensa inmunitaria mediante la atracción y activación de células relacionadas con la respuesta inflamatoria, principalmente monocitos, células dendríticas inmaduras y células T. Algunas defensinas pueden, además, neutralizar toxinas microbianas como, por ejemplo, las toxinas de *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diptheridae* o *Staphylococcus aureus* (Ganz et al. 1985, Daher et al. 1986, Lehrer et al. 1989, Abbas et al. 2008g, Tizard 2009q).

- **Catelicidinas:** se trata de péptidos de 12 a 80 aminoácidos de longitud que se expresan en los neutrófilos y en los epitelios de la piel y en las mucosas digestiva y respiratoria. Su proteína precursora se transcribe para su proteólisis en dos péptidos. Poseen un amplio espectro de actividades antibacterianas. Las catelicidinas se almacenan en el interior de las células en su forma inactiva y, tanto la síntesis del precursor como la posterior proteólisis, pueden estimularse por las citocinas de la inflamación y los productos microbianos. El fragmento del extremo carboxílico ejerce una actividad tóxica directa sobre diversos microorganismos y, además, activa respuestas inmunitarias en leucocitos y otros tipos celulares (Zanetti 2004, Abbas et al. 2008g, Tizard 2009q).

- **Citocinas:** las células del sistema inmunitario requieren de una comunicación que permita coordinar sus efectos. Dicha comunicación es llevada a cabo en gran medida por las citocinas, mediadores polipeptídicos de bajo peso molecular secretados en respuesta a diferentes estímulos que participan tanto en las respuestas inmunitarias innatas como en las adaptativas, estando implicados, además, en el crecimiento y diferenciación celular, en la inflamación y en la reparación tisular (Nicod 1993, Abbas et al. 2008d, Tizard 2009f). La combinación de citocinas que son producidas en respuesta a una agresión determina el tipo de respuesta inmunitaria que se desencadena (Steinke & Borish 2006). En general son secretadas por células del sistema inmunitario y actúan, a su vez, sobre células del sistema inmunitario. Sin embargo, otras células del organismo son capaces del mismo modo de producir algunas de estas moléculas o de responder frente a ellas, como ocurre, por ejemplo, con algunas células endoteliales o con ciertos fibroblastos (Nicod 1993, Abbas et al. 2008d). Asimismo, ciertas citocinas son responsables de algunos de los procesos implicados en la hematopoyesis, como veremos más adelante (Nicod 1993, Abbas et al. 2008d). La producción de las citocinas se origina en respuesta a diferentes señales, entre las que destacan ciertos estímulos que inician las respuestas adaptativas, como son los antígenos que actúan a través de los receptores de los linfocitos y los complejos antígeno-anticuerpo que actúan sobre los receptores de anticuerpos, así como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que actúan a través de los receptores de tipo Toll y que participan en las respuestas innatas (Tizard 2009f).

A pesar de que las citocinas forman un grupo heterogéneo desde el punto de vista estructural, todas ellas comparten una serie de propiedades: en primer lugar, son moléculas de vida corta y su secreción es un fenómeno breve y autolimitado, no existiendo habitualmente un almacenamiento como moléculas preformadas. Su síntesis se inicia por la transcripción génica transitoria consecuencia de la activación celular

ante los diferentes estímulos y, una vez sintetizadas, son secretadas rápidamente, dando lugar a un estallido de liberación cuando es necesario. Por otra parte, las citocinas pueden actuar a nivel local o sistémico. La mayoría de estas proteínas actúan cerca del lugar donde han sido secretadas, ejerciendo su función bien sobre la misma célula productora (acción autocrina) o sobre células vecinas (acción paracrina). Sin embargo, ciertas citocinas pueden ejercer acciones endocrinas, al ser secretadas al torrente circulatorio y actuar así a distancia. Uno de los ejemplos más característicos de esta acción endocrina es el factor de necrosis tumoral (TNF), con efectos tanto locales como sistémicos importantes. Además, las acciones de las citocinas son con frecuencia pleiotrópicas, es decir, que una misma citocina actúa sobre diferentes tipos celulares, no limitándose a una única diana y permitiendo así que un mismo mediador proteico inicie diferentes efectos biológicos. Por otra parte, las citocinas son redundantes en sus efectos, ya que diferentes moléculas ejercen las mismas funciones (Semenzato 1990, Abbas et al. 2008d, Tizard 2009f).

Para que puedan iniciarse estos efectos biológicos de las citocinas, sean o no autocrinos, paracrinos o endocrinos y redundantes y/o pleiotrópicos, estas moléculas deben unirse a receptores de membrana específicos en sus células diana. La expresión de estos receptores y, por tanto, la reactividad de las células ante las citocinas, está regulada por una serie de señales externas, de forma que ante un estímulo concreto, una célula determinada puede aumentar o disminuir su expresión del receptor de una citocina, mecanismo que permite mantener una especificidad de las respuestas inmunitarias. Esa señal externa que regula la expresión de los receptores de citocinas puede consistir, por ejemplo, en un antígeno bacteriano o en las propias citocinas, incluso la misma que se une al receptor, pudiendo existir una amplificación positiva o una retroalimentación negativa. De esta misma forma, las citocinas influyen frecuentemente en la síntesis y las acciones de otras citocinas (Abbas et al. 2008d, Tizard 2009f).

Debido a la diversidad estructural de este grupo proteico de mediadores de las respuestas inmunitarias, a lo largo del tiempo se ha tratado de hacer diversas clasificaciones. En la actualidad se tiende a emplear aquellas clasificaciones basadas en la estructura proteica o en las funciones que desempeñan las diversas citocinas. Así, por una parte, vamos a poder hablar de varias familias estructurales de estas proteínas: la familia más amplia es la que constituye el *grupo 1*. Son polipéptidos que poseen cuatro hélices- α enrolladas entre sí. En este grupo se incluye un gran número de interleucinas (IL-2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -11, -13, -15, -21, -23, -30), así como la hormona del crecimiento, leptina, eritropoyetina y prolactina. También se han incluido

en el grupo 1 dos subfamilias de citocinas relacionadas: la subfamilia del interferón (IFN- α/β , IFN- γ) y la subfamilia de la IL-10. Las citocinas del *grupo 2* están formadas por cadenas largas de láminas- β , e incluyen los factores de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la IL-1 α , la IL-1 β y la IL-18. Las citocinas del *grupo 3* son pequeñas proteínas que poseen hélices- α y láminas- β e incluyen las quimiocinas y otras proteínas relacionadas. El *grupo 4* está constituido por citocinas formadas por dominios con motivos variados y el representante típico es la IL-12. Hay una serie de citocinas que presentan estructuras singulares y no pertenecen a ninguna de estas familias principales: son la IL-14, la IL-16 y la IL-17 (Tizard 2009f).

Por otra parte, podemos hablar de tres categorías funcionales de citocinas en función de sus principales acciones biológicas: los mediadores y reguladores de la inmunidad adaptativa, los estimuladores de la hematopoyesis y los mediadores y reguladores de la inmunidad innata. Los *mediadores y reguladores de la inmunidad adaptativa* son citocinas sintetizadas principalmente por los linfocitos T tras el reconocimiento antigénico y son capaces de actuar a varios niveles en las respuestas adquiridas. Así, algunas de estas moléculas promueven el crecimiento y diferenciación de ciertas poblaciones de linfocitos, mientras que otras atraen, activan y regulan la función de fagocitos mononucleares, neutrófilos o eosinófilos. Dentro de este grupo funcional de citocinas destacan las IL-2, -4, -5 y -13, así como el IFN- γ . Este último posee funciones importantes tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Por otra parte, los *estimuladores de la hematopoyesis* son citocinas secretadas por células de la médula ósea, leucocitos y otros tipos celulares y entre ellos destacan el Factor de Células Progenitoras, la IL-7 y la IL-3. Estas proteínas son necesarias para la hematopoyesis normal, estimulando el crecimiento y diferenciación de las células progenitoras de la médula ósea, asegurándose así el suministro de nuevos leucocitos en las reacciones inmunitarias e inflamatorias, procesos en los que se está generando un consumo acelerado de dichas células. En respuesta a los microorganismos infecciosos, ciertos leucocitos, principalmente los fagocitos mononucleares, sintetizan las citocinas que actúan como *mediadores y reguladores de la inmunidad innata*. Esta secreción de citocinas es la responsable de muchas de las funciones efectoras de las respuestas inmunitarias innatas tempranas frente a virus y bacterias (Abbas et al. 2008d). A continuación vamos a hacer una breve descripción de las citocinas de mayor relevancia como mediadores de la inmunidad innata, comenzando por el factor de necrosis tumoral- α , para continuar con la IL-1, las quimiocinas más importantes, la IL-12, los interferones de tipo I, el interferón- γ , la IL-10 y la IL-6.

▪ Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α): es una proteína trimérica de 25 kDa producida por macrófagos, mastocitos, linfocitos T y B, células NK, células endoteliales y fibroblastos y es considerada el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a bacterias gramnegativas y otros microorganismos (Tizard 2009l, Abbas et al. 2008d). Esta citocina ejerce un papel central en la activación de la respuesta inflamatoria, estimulando la atracción leucocitaria hacia los focos de lesión tisular y activando a estas células para la eliminación de los agentes causantes del daño (Ming et al. 1987, Abbas et al. 2008d, Tizard 2009l). Por otra parte, gracias a su capacidad para potenciar la presentación antigénica y coestimular a los linfocitos T, contribuye a la comunicación entre inmunidad innata e inmunidad adaptativa (Semenzato 1990, Tizard 2009l). Para llevar a cabo sus efectos biológicos, el TNF- α actúa tanto sobre las células endoteliales vasculares como sobre los leucocitos. A nivel de las células endoteliales de los pequeños vasos sanguíneos estimula la expresión de moléculas de adhesión sobre su superficie que permitan que los leucocitos se adhieran a ellas (Gamble et al. 1985, Semenzato 1990, Tizard 2009l). Además, promueve la secreción de quimiocinas y otras citocinas, favoreciendo de este modo la migración, adherencia y activación de los leucocitos en el foco de la inflamación (Bachwich et al. 1986, Abbas et al. 2008d, Tizard 2009l). Esta citocina actúa sobre los neutrófilos mediante su reclutamiento y estimulación de sus actividades microbicidas, estimula la fagocitosis y síntesis de productos oxidantes por parte de los macrófagos y activa a los mastocitos (Philip & Epstein 1986, Abbas et al. 2008d, Tizard 2009l). Asimismo, se ha observado que el TNF- α es capaz de inducir apoptosis sobre algunas células tumorales o infectadas mediante la activación de caspasas (Tizard 2009l). A pesar de la contribución, en principio beneficiosa, de esta citocina a la instauración de las primeras respuestas ante las agresiones, es capaz asimismo de producir algunas reacciones locales perjudiciales para el hospedador e, incluso, cuando es sintetizado en grandes cantidades tras un estímulo lo suficientemente intenso, puede inducir la aparición de reacciones sistémicas (Abbas et al. 2008d). La acción sistémica del TNF- α se caracteriza por la aparición de fiebre, al actuar sobre el hipotálamo, y por la síntesis de proteínas de fase aguda, por su efecto a nivel hepático. Pero, además, en aquellos casos en los que la concentración plasmática alcanzada de TNF- α es muy elevada, puede observarse la aparición de caquexia (Tracey et al. 1988, Abbas et al. 2008d), debido a la supresión del apetito y la inhibición de la síntesis de enzimas implicadas en la utilización de los ácidos grasos por los tejidos, disminución del gasto cardíaco e hipotensión, trombosis e hipoglucemia. De hecho, una complicación importante de las infecciones bacterianas graves es lo que se denomina “síndrome de choque séptico”, caracterizado por la aparición

de hipotensión, coagulación intravascular diseminada y alteraciones metabólicas y que se debe a la síntesis inducida por lipopolisacárido (LPS) de TNF- α , IL-12, IFN γ e IL-1 (Abbas et al. 2008d, Tizard 2009o).

- Interleucina-1 (IL-1): esta citocina es sintetizada principalmente por los fagocitos mononucleares una vez que han sido estimulados por ciertos productos bacterianos, principalmente LPS, o por otras citocinas, entre las que destaca el TNF- α . Otras células, como neutrófilos, células epiteliales y células endoteliales, son capaces asimismo de sintetizar IL-1. Esta proteína posee funciones muy similares a las descritas para el TNF- α , actuando juntos en la inmunidad innata y en la inflamación. La IL-1 actúa sobre las células del endotelio vascular para promover la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria y estimula la síntesis por parte de los macrófagos de la sintasa de óxido nítrico-2 (NOS-2) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), promoviendo y prolongando la inflamación. Al igual que ocurre con el TNF- α , cuando se alcanzan concentraciones elevadas, cierta cantidad de IL-1 es capaz de pasar al torrente sanguíneo e inducir la aparición de efectos sistémicos, entre los que destacan la fiebre, aparición de edemas y tumefacción, letargia, malestar, pérdida de apetito y aumento de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda (Abbas et al. 2008d, Tizard 2009l).

- Quimiocinas: las quimiocinas forman una extensa familia de proteínas de pequeño tamaño, de unos 8 a 10 kDa, estructuralmente homólogas, que poseen dos bucles disulfuro internos y que estimulan el movimiento leucocitario y regulan la migración celular desde la sangre a los tejidos. Son, por tanto, citocinas quimiotácticas y pueden ser sintetizadas por diferentes tipos celulares. Se han clasificado en cuatro familias en función del número y posición de los residuos de cisteína de su estructura. Ciertas quimiocinas son sintetizadas en respuesta a estímulos externos y ejercen una acción atrayente sobre leucocitos hacia la zona de inflamación o de invasión microbiana. Esta atracción leucocitaria es regulada por una serie de acciones secuenciales de estas proteínas sobre las células: las quimiocinas se unen a la superficie de las células endoteliales y facilitan la adherencia de los leucocitos al endotelio, como paso previo a su migración tisular. Según la quimiocina secretada, varía el tipo leucocitario que es atraído al foco inflamatorio y, de esta forma, el organismo es capaz de controlar la composición de la población de células del sistema inmunitario que actúa en una determinada localización para asegurar la respuesta más eficaz frente a los diferentes patógenos. Pero, además, existe otro grupo de quimiocinas que no participan en los procesos inflamatorios, sino que son sintetizadas de forma constitutiva en ciertos tejidos y son las encargadas de regular el tránsito celular a

través de estos tejidos. Se ha observado que la función principal de ciertas citocinas consiste en la regulación de la migración normal de las células inmunitarias, principalmente linfocitos, hacia los órganos linfáticos. Otras favorecen la angiogénesis y la curación de las heridas e, incluso, pueden participar en el desarrollo de órganos no linfáticos (Abbas et al. 2008d, Tizard 2009l).

- Interleucina-12 (IL-12): esta citocina constituye un importante mediador de la respuesta inmunitaria temprana frente a microorganismos intracelulares. Se trata de un heterodímero compuesto por dos glicoproteínas de 35 y 40 kDa aproximadamente que se encuentran unidas covalentemente mediante un único puente disulfuro para formar una molécula activa de unos 70 kDa (Stanley et al. 1994). Los principales productores de la IL-12 en la inmunidad innata son las células dendríticas activadas y los macrófagos. Esta citocina fue descrita inicialmente como un activador de la citotoxicidad de los linfocitos NK, denominándose originalmente por los dos grupos investigadores que la describieron en primer lugar tras su descubrimiento en trabajos independientes CLMF (de sus siglas en inglés “cytotoxic lymphocyte maturation factor”) y NKSF (“natural killer cell stimulatory factor”), respectivamente (Stern et al. 1990, Kobayashi et al. 1989). Ha sido descrito que la IL-12 potencia las funciones citotóxicas de los linfocitos NK activados y de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) tanto *in vitro* como *in vivo* (Stanley et al. 1994). Sin embargo, en la actualidad se sabe que los efectos biológicos de la IL-12 van más allá de una simple estimulación de la citotoxicidad, ya que esta citocina participa además en la estimulación de la síntesis de otras citocinas, principalmente IFN- γ por parte de los linfocitos T y NK, favorece la diferenciación de los linfocitos T cooperadores CD4+ hacia la subpoblación de linfocitos Th1, que son a su vez, productores de IFN- γ , estimula la proliferación de linfocitos NK y T activados, inhibe la secreción de ciertas inmunoglobulinas e, incluso, posee ciertas funciones sobre los procesos hematopoyéticos (Brunda 1994, Stanley et al. 1994, Abbas et al. 2008d). Por lo tanto, la IL-12 constituye un importante vínculo entre inmunidad innata y adaptativa, ya que es sintetizada en las primeras etapas de la respuesta inmunitaria innata frente a microorganismos intracelulares y, posteriormente, contribuye a la instauración de las respuestas adaptativas frente a estos mismos microorganismos (Abbas et al. 2008d).

- Interferones de tipo I: los interferones (IFN) de tipo I fueron las primeras citocinas descubiertas gracias a los estudios llevados a cabo por Isaacs y Lindenmann publicados en 1957 (Isaacs & Lindenmann 1957). El nombre de

“interferón” proviene de su elevada capacidad para “interferir” en la replicación vírica (Isaacs & Lindenmann 1957, Abbas et al. 2008d), si bien estas moléculas son tanto pleiotrópicas como redundantes y poseen otras funciones biológicas de importancia (Fitzgerald-Bocarsly & Feng 2007). La familia del IFN de tipo I está constituida por una serie de citocinas relacionadas estructuralmente que participan en la inmunidad innata que se desarrolla de forma temprana en las infecciones víricas y favorecen la inmunidad celular frente a patógenos intracelulares, actuando como inmunomoduladores (Takaoka & Yanai 2006, Fitzgerald-Bocarsly & Feng 2007, Abbas et al. 2008d, Tizard 2009b). Dentro del tipo I destacan los IFN- α y el IFN- β . Existe una gran variedad de células que son capaces de sintetizar IFN de tipo I, aunque la capacidad de cada uno de estos tipos celulares para producir estos polipéptidos varía, siendo las células dendríticas plasmocitoides (pDCs) las mayores productoras de estas citocinas (Asselin-Paturel & Trinchieri 2005, Fitzgerald-Bocarsly et al. 2008), especialmente de IFN- α . Los fagocitos mononucleares son también importantes productores de esta molécula (Abbas et al. 2008d), mientras que el IFN- β , aunque puede ser producido por diversos tipos celulares, es sintetizado mayoritariamente por fibroblastos, lo que llevó en un origen a que se denominara “IFN fibroblástico” (Abbas et al. 2008d). Sea cual sea el tipo celular implicado en la síntesis de estos IFNs de tipo I, ésta se induce tras el reconocimiento de componentes de los patógenos durante la infección, resultando los estímulos más potentes los ácidos nucleicos víricos y, en menor medida, ciertos componentes bacterianos, como lipopolisacáridos de membrana (Taniguchi & Takaoka 2002, Abbas et al. 2008d). Posteriormente a este reconocimiento de los patógenos, los IFN de tipo I son responsables de la inducción de la transcripción de diversos genes que participan de manera clave en la resistencia del hospedador frente a las infecciones víricas y en la activación de componentes del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo, participando en la maduración de células presentadoras de antígeno y en la producción por parte de éstas de citocinas implicadas en la activación de linfocitos T, B y NK (Perry et al. 2005). Por tanto, entre las funciones biológicas de estos polipéptidos destacan: la inhibición de la replicación vírica mediante la síntesis de enzimas que interfieren con la transcripción del ARN o ADN vírico (Perry et al. 2005, Abbas et al. 2008d); la estimulación de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I, potenciando de este modo el reconocimiento antigénico, ya que los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ reconocen los antígenos unidos a estas moléculas (Abbas et al. 2008d); la regulación de la supervivencia, proliferación y citotoxicidad de las células NK mediante la inducción de la síntesis de otra citocina, la IL-15 (Perry et al. 2005, Abbas et al.

2008d); la estimulación de la síntesis de quimiocinas que permiten el reclutamiento de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos (Perry et al. 2005, Abbas et al. 2008d); la estimulación de la diferenciación de monocitos en células dendríticas, así como la maduración y activación de éstas (Tizard 2009b); y la proliferación de células T de memoria, activando a los linfocitos T vírgenes y estimulando el desarrollo de linfocitos Th1 específicos, al favorecer la expresión de receptores para la IL-12 sobre la superficie de las células T (Abbas et al. 2008d, Tizard 2009b).

- Interferón- γ (IFN- γ): el IFN- γ es el único miembro de los IFN de tipo II y, a diferencia de los anteriores, no presenta una actividad antivírica potente (Schroder et al. 2004, Abbas et al. 2008d). Se trata de una proteína homodimérica que juega un papel central en las respuestas inmunitarias frente a patógenos intracelulares y en la inmunidad antitumoral (Chen & Liu 2009) y es el principal activador macrofágico (Schroder et al. 2004, Abbas et al. 2008d). La producción de IFN- γ es llevada a cabo tanto por células del sistema inmunitario innato como por células de la inmunidad adquirida. Entre las primeras, la síntesis de esta citocina es llevada a cabo por parte de los linfocitos NK y los linfocitos T $\gamma\delta$, aunque, bajo ciertos estímulos, las células presentadoras de antígeno profesionales son también capaces de producirla (Schroder et al. 2004, Abbas et al. 2008d, Chen & Liu 2009). Los linfocitos NK sintetizan IFN- γ en respuesta a los ligandos activadores que se localizan en la superficie de las células que han sido sometidas a agresiones o bien en respuesta a la secreción de IL-12 y, una vez liberado, este IFN- γ actúa como mediador en la inmunidad innata (Abbas et al. 2008d). En las respuestas adaptativas, los principales responsables de la síntesis de IFN- γ son los linfocitos T CD4⁺ Th1 y los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (Schroder et al. 2004, Abbas et al. 2008d, Chen & Liu 2009) en respuesta al reconocimiento antigénico, aumentando esta síntesis en presencia de IL-12 e IL-18. Es importante resaltar que las respuestas inmunitarias en las que participan la IL-12 y el IFN- γ son fundamentales en la inmunidad celular frente a microorganismos intracelulares (Abbas et al. 2008d). Dentro de las acciones biológicas de esta citocina destacan los efectos que ejerce sobre los monocitos y macrófagos, células que son consideradas la primera línea de defensa frente a los microorganismos infecciosos. Su principal efecto sobre ellas es la estimulación de los mecanismos citotóxicos para destruir los microorganismos fagocitados, efecto que lleva a cabo mediante la activación de la transcripción de genes que codifican enzimas que son necesarias para la generación, dentro de los lisosomas, de especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos del nitrógeno (Young & Hardy 1995, Schroder et al. 2004, Abbas et al. 2008d). Además de este efecto, el

IFN- γ activa otras funciones macrofágicas, como la citotoxicidad tumoral y la destrucción de patógenos intracelulares (Young & Hardy 1995). Además, es capaz de estimular el procesamiento y presentación de antígenos mediante el incremento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II y otros coestimuladores sobre las células presentadoras de antígeno profesionales, lo que va ser de gran importancia en la regulación de las respuestas inmunitarias frente a los patógenos intracelulares (Young & Hardy 1995, Schroder et al. 2004, Abbas et al. 2008d). Por otra parte, esta citocina promueve la atracción leucocitaria, al actuar sobre las células endoteliales vasculares y favorecer la adhesión leucocitaria y su extravasación a los focos de infección (Schroder et al. 2004, Abbas et al. 2008d, Chen & Liu 2009). El IFN- γ afecta también al desarrollo y diferenciación de los linfocitos T. En este sentido, el fenotipo que desarrollan los linfocitos T cooperadores CD4+ vírgenes depende directamente de la expresión de IFN- γ y de IL-4, de forma que el IFN- γ inhibe la diferenciación de los linfocitos T CD4+ de la subpoblación Th2 (productora de IL-4) y actúa como un factor de crecimiento autocrino, de manera sinérgica con la IL-12, para el crecimiento y diferenciación de la subpoblación Th1 (linfocitos CD4+ productores de IFN- γ e IL-2) (Young & Hardy 1995, Abbas et al. 2008d). El IFN- γ actúa también sobre los linfocitos B, favoreciendo el cambio a ciertas clases de inmunoglobulinas G (IgG) y actuando sobre el cambio de isotipo dependiente de IL-4, aunque la actuación de esta citocina sobre estas células parece tener diversos efectos (Young & Hardy 1995, Abbas et al. 2008d). Así, se ha observado un efecto negativo de este IFN- γ sobre las poblaciones de linfocitos B tempranos y efectos antiapoptóticos sobre células B maduras (Young & Hardy 1995). Otras funciones biológicas de esta citocina incluyen el incremento de la actividad citotóxica de los linfocitos NK (Schroder et al. 2004), la estimulación de la fagocitosis y citotoxicidad de los neutrófilos y la supresión del desarrollo de las células progenitoras hematopoyéticas tempranas cuando el IFN- γ actúa de forma “solitaria”, actuando, en cambio, incrementando el desarrollo de estas células progenitoras cuando se une a otras citocinas (Young & Hardy 1995).

- Interleucina-10 (IL-10): hasta ahora se han descrito las citocinas que actúan principalmente estimulando los mecanismos inmunitarios innatos, pero también es necesario que exista una inhibición de ciertos procesos, de forma que se eviten respuestas exacerbadas que lleven al desarrollo de daños tisulares o sistémicos en el hospedador. En este sentido, la IL-10 constituye una molécula crítica en la inmunorregulación (Mege et al. 2006, Abbas et al. 2008d, Couper et al. 2008). Se trata de una proteína perteneciente a la familia de las citocinas de estructura

constituida por hélices α (Mege et al. 2006). La producción de IL-10 puede ser llevada a cabo por macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y varias subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Mege et al. 2006, Couper et al. 2008) para inducir una serie de funciones biológicas que permitan controlar las reacciones inmunitarias innatas y de la inmunidad celular. Estos efectos de la IL-10 se desarrollan gracias a la capacidad de esta molécula para inhibir muchas de las funciones de los macrófagos y células dendríticas activadas, limitando de esta forma las respuestas Th1 y Th2 (Mege et al. 2006, Abbas et al. 2008d, Couper et al. 2008). Los macrófagos y las células dendríticas responden frente a los microorganismos mediante la secreción de ciertas citocinas y la expresión de coestimuladores en su superficie que permiten la posterior activación de los linfocitos de la inmunidad adaptativa celular: la IL-10 se encarga de finalizar estas respuestas de los macrófagos y células dendríticas que han sido activados por los microorganismos. Para ello actúa principalmente a dos niveles: por una parte, la IL-10 limita la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 α y β , IL-6, IL-12, IL-18 y TNF- α) y quimiocinas y, por otra parte, inhibe la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y coestimuladores por parte de los macrófagos y células dendríticas. Además, es capaz de actuar de forma directa sobre los linfocitos T CD4⁺ mediante la inhibición de su proliferación y producción de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 y TNF- α (Couper et al. 2008).

- Interleucina 6 (IL-6): se trata de un homodímero en el que cada subunidad forma un dominio globular con cuatro hélices α (Abbas et al. 2008d) y que participa tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa (Abbas et al. 2008d, Tizard 2009). Esta citocina es sintetizada por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y linfocitos T activados en respuesta a diferentes estímulos, entre los que destacan las endotoxinas bacterianas y otras citocinas, principalmente IL-1 y TNF- α (Abbas et al. 2008d, Tizard 2009). En los procesos de la inmunidad innata, la IL-6 actúa mediante la estimulación de la producción de neutrófilos a partir de sus progenitores de la médula ósea y favoreciendo la síntesis de proteínas de fase aguda, por lo que se ha sugerido que esta citocina regula la transición entre las primeras fases de la inflamación llevadas a cabo por los neutrófilos y fases posteriores en las que las células predominantes son los macrófagos (Abbas et al. 2008d Tizard 2009). En la inmunidad adaptativa, la IL-6 se caracteriza por estimular el crecimiento de las células plasmáticas y por favorecer la comunicación entre leucocitos mediante la estimulación de la síntesis de citocinas proinflamatorias (Abbas et al. 2008d).

2.1.1.2. Reconocimiento innato de los agentes patógenos

Para que los diferentes componentes del sistema inmunitario innato descritos puedan ejercer sus funciones efectoras, es evidente que deben ser activados y, para ello, debe existir algún tipo de reconocimiento de los patógenos. Además, la principal diferencia existente entre la inmunidad innata y la adaptativa se basa precisamente en los mecanismos y los receptores que están involucrados en este reconocimiento (Medzhitov & Janeway 2000). Las respuestas inmunitarias adaptativas emplean una serie de receptores de antígenos que se generan en un proceso de reordenamiento somático aleatorio, como veremos más adelante. En cambio, las respuestas inmunitarias innatas dependen de un número limitado de receptores que se encuentran codificados en la línea germinal y reconocen patrones moleculares conservados que se encuentran únicamente en los microorganismos (Janeway 1992, Medzhitov & Janeway 1997a, Kimbrell & Beutler 2001).

El sistema inmunitario innato ha empleado como estrategia para el reconocimiento de los microorganismos patógenos o de las células infectadas o lesionadas la detección de ciertas estructuras que se encuentran altamente conservadas entre diferentes tipos de agentes, que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos o para su patogenicidad y que son producidas únicamente por microorganismos, no por las células del hospedador (Janeway 1989, Abbas et al. 2008g, Tizard 2009l). Estas estructuras son denominadas tradicionalmente “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP, de sus siglas en inglés), si bien es importante recalcar que muchas de estas estructuras se encuentran o son sintetizadas por microorganismos no patógenos (Janeway 1989, Medzhitov & Janeway 1997b). Entre estas moléculas probablemente la mejor caracterizada y más estudiada es el lipopolisacárido (LPS) presente en la mayoría de las bacterias gramnegativas, aunque también destacan otros, como los peptidoglicanos de las bacterias grampositivas, los ácidos lipoteitoicos, los mananos, el ADN bacteriano, el RNA de doble cadena y ciertos glucanos (Medzhitov & Janeway 2000, Janeway & Medzhitov 2002, Beutler 2004, Tizard 2009l).

El reconocimiento inmunitario innato de estas moléculas es llevado a cabo por los denominados “receptores de reconocimiento de patrones” (PRRs, de sus siglas en inglés), que se encuentran codificados en la línea germinal, por lo que la especificidad de cada receptor está predeterminada genéticamente (Janeway 1989, Medzhitov & Janeway 2000). Se expresan en numerosas células efectoras del sistema inmunitario innato, entre las que cabe destacar los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células endoteliales, células

epiteliales y linfocitos (Medzhitov & Janeway 2000, Abbas et al. 2008g). Desde un punto de vista estructural, estos receptores pertenecen a varias familias de proteínas (Medzhitov & Janeway 1997a) y pueden expresarse sobre la superficie celular, en vesículas endosómicas o en el citoplasma de las células (Abbas et al. 2008g). Además, ciertos PRRs son secretados, ejerciendo una acción similar a opsoninas, al unirse específicamente a las paredes de las células microbianas para su posterior fagocitosis o reconocimiento por parte del sistema de complemento. Entre estas moléculas podemos citar a la lectina de unión a manosa, la proteína C reactiva y la proteína amiloide sérica (Fraser et al. 1998), que son secretadas en las respuestas de fase aguda.

Algunos PRRs son expresados en la superficie celular de los macrófagos y median la fagocitosis de los microorganismos que expresen los PAMP específicos. Un ejemplo de este tipo de receptores de reconocimiento de patrones es el receptor de manosa macrofágico, que interacciona con bacterias grampositivas y gramnegativas y con ciertos tipos de hongos (Fraser et al. 1998).

Por otra parte, dado que los virus y numerosas bacterias son capaces de penetrar en las células del hospedador, es necesario que existan receptores de reconocimiento de patrones que se expresen en el citoplasma. Entre estos PRRs destacan la proteína quinasa PKR, que se activa tras su unión al ARN durante la infección vírica y bloquea la síntesis proteica viral y celular e induce la síntesis de IFN de tipo I, y la familia de los receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótido) (Clemens & Elia 1997).

Sin duda, los receptores de reconocimiento de patrones más importantes y más conocidos son los receptores tipo Toll (TLR), glucoproteínas de membrana de cadena corta que se expresan principalmente en las células centinela en las superficies corporales. Pueden ser expresados en las superficies de las células o en membranas endosomales del interior celular (Tizard 2009). Se han descrito unos 14 TLRs que se diferencian en sus especificidades, los patrones de expresión y, probablemente, en los genes diana que inducen (Janeway & Medzhitov 2002). A menudo se asocian unos TLR con otros para reconocer y unirse a los PAMP y ejercer sus acciones de forma conjunta (Tizard 2009).

Por otra parte, a pesar de que hasta el momento sólo se ha descrito el reconocimiento por parte de los receptores del sistema inmunitario de los denominados PAMP, estos receptores también pueden reconocer células del hospedador agredidas o lesionadas y, por tanto, iniciar respuestas inmunitarias ante estas señales (Abbas et al. 2008g, Tizard 2009). Las moléculas que son liberadas tras la lesión o muerte celular son las denominadas alarminas. Algunos autores (Tizard 2009), denominan patrones

moleculares asociados a lesión al conjunto de todas las señales que inician las respuestas inmunitarias innatas (alarminas y PAMPs). Entre las alarminas encontramos algunos grupos de moléculas que ya han sido mencionados en esta revisión, como son las defensinas, las catelicidinas y ciertas quimiocinas.

Una vez que los receptores inmunitarios innatos han reconocido una señal de lesión, sea una alarmina o un PAMP, se inician en la célula efectora una serie de procesos de manera secuencial que conducen a que dicha célula lleve a cabo sus funciones biológicas de forma inmediata, sin precisar de una proliferación previa, como ocurre en las respuestas adaptativas (Medzhitov & Janeway 2000). Entre las funciones que se desencadenan tras la activación de los receptores y de las vías de transducción de señales asociadas a ellos destacan la estimulación de la fagocitosis, la activación del sistema del complemento y de la cascada de la coagulación, la inducción de la síntesis de péptidos antimicrobianos y la inducción de la enzima NOS por parte de las células de la inmunidad innata (Medzhitov & Janeway 1998). Asimismo, se induce la producción de una serie de quimiocinas y citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras sobre las células presentadoras de antígeno, lo que conduce al reclutamiento de leucocitos y a la regulación de la activación de los mecanismos efectores más adecuados en cada caso (Medzhitov & Janeway 1998).

Cada microorganismo presenta lo que puede denominarse una “firma inmunitaria” innata, que viene determinada por su contenido en los diferentes PAMPs que son reconocidos por los PRRs. Esta firma permite que se inicien las rutas de transducción de señales que son más adecuadas en la generación de cada respuesta inmunitaria de cada estímulo infeccioso en concreto (Beutler 2004).

2.1.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA

La primera línea de defensa que se instaura ante una agresión es aportada por la inmunidad innata mediante respuestas rápidas pero de duración limitada y carentes de memoria inmunitaria a través de los mecanismos ya descritos. Los vertebrados superiores son capaces de desarrollar, además, respuestas inmunitarias adaptativas que precisan de más tiempo para ponerse en funcionamiento pero que son más flexibles, altamente específicas y duraderas y que permiten combatir infecciones o agresiones capaces de evadir las respuestas innatas. Además, poseen la habilidad de “recordar” y “aprender” de las exposiciones sucesivas a un mismo agente para aumentar así cada vez en magnitud y capacidad defensiva (Medzhitov & Janeway 2000, Clark & Kupper 2005, Borghesi & Milcarek 2007, Abbas et al. 2008j, Tizard 2009h). No se debe olvidar, sin embargo, que para que se produzca una activación efectiva de estas respuestas adquiridas es imprescindible la existencia de una interacción con el sistema inmunitario innato (Medzhitov & Janeway 2000, Clark & Kupper 2005).

Como se ha comentado anteriormente, entre las principales diferencias existentes entre ambos tipos de inmunidad destacan los mecanismos de reconocimiento inmunitario. En la inmunidad innata el reconocimiento se basa en la existencia de un número de receptores limitado que se encuentran codificados en la línea germinal y reaccionan ante patrones moleculares altamente conservados, característicos de los principales grupos de patógenos. En cambio, la funcionalidad de la inmunidad adaptativa se basa en la capacidad que presenta para generar de forma aleatoria un amplísimo espectro de receptores por mecanismos somáticos de reorganización génica que conducen al reconocimiento potencial de cualquier antígeno, conservado o exclusivo de un único patógeno. Estos receptores son distribuidos clonalmente en los linfocitos T y B y, cuando se produce la exposición a un antígeno, aquellos linfocitos que poseen receptores útiles son seleccionados para una expansión clonal (Medzhitov & Janeway 2000, Clark & Kupper 2005, Borghesi & Milcarek 2007, Tizard 2009h).

Una de las principales ventajas de las respuestas inmunitarias adaptativas frente a las innatas viene dada precisamente por esta generación aleatoria de un amplio repertorio de receptores, lo que confiere a la inmunidad adquirida de una excelente especificidad. Estos receptores son capaces de discernir pequeñas diferencias en la estructura de dos antígenos, al reconocer diversas porciones de un solo complejo proteico, polisacárido u otra molécula, que se denominan determinantes antigénicos o epítomos (Medzhitov & Janeway 1998, Abbas et al. 2008j). Esto hace que exista un número elevadísimo de clones

de linfocitos (repertorio linfocítico) con sus receptores específicos, por lo que las respuestas inmunitarias adaptativas se caracterizan por presentar una gran diversidad (Abbas et al. 2008j).

Por otra parte, además de las elevadas especificidad y diversidad, existe otra propiedad que define a la inmunidad adaptativa y que dota a estas respuestas de otra ventaja frente a las innatas: se trata de la denominada “memoria inmunitaria”. Esta característica favorece el desarrollo de respuestas inmunitarias más rápidas y amplias ante la segunda y sucesivas exposiciones a un mismo antígeno, ya que el sistema adaptativo es capaz de recordar y adaptarse a las agresiones que sufre el organismo. Esta memoria se debe, por una parte, a que con cada exposición a un antígeno se amplía el clon de linfocitos específicos que se desarrollan frente a él y, por otra parte, a que se generan células de memoria de vida larga capaces de reaccionar de forma más rápida y enérgica a como lo hacen los linfocitos vírgenes (Janeway & Medzhitov 2002, Abbas et al. 2008j).

Otros rasgos característicos de la inmunidad adaptativa son la capacidad de generar una expansión clonal, o aumento en la cantidad de células que expresan receptores idénticos frente al mismo antígeno, y la falta de reactividad frente a sí mismo o autotolerancia, que se logra mediante la eliminación de aquellos linfocitos que expresan receptores específicos frente a antígenos propios.

Por otra parte, para lograr la máxima eficacia en las respuestas frente a las agresiones, el sistema inmunitario ha tendido hacia la especialización, organizando mecanismos de defensa específicos para cada tipo de microorganismo. Así, en función del tipo de agresión, el sistema inmunitario puede generar dos tipos de respuestas, al igual que se ha descrito en la inmunidad innata: respuestas inmunitarias de tipo humoral y respuestas inmunitarias de tipo celular. A grandes rasgos, la inmunidad adaptativa humoral es el principal mecanismo de defensa frente a las infecciones por microorganismos extracelulares y emplea una serie de moléculas denominadas anticuerpos que son generadas por los linfocitos B. Estos anticuerpos son capaces de reconocer los antígenos y, mediante su unión a ellos, marcarlos para su eliminación. Los propios anticuerpos poseen, asimismo, una cierta especialización, de forma que cada tipo diferente puede estimular la puesta en marcha de diferentes mecanismos efectores (Abbas et al. 2008j). Por otra parte, la inmunidad adaptativa celular se instaura principalmente para hacer frente a las agresiones intracelulares y depende de los linfocitos T (Abbas et al. 2008j).

2.1.2.1. Componentes de la inmunidad adaptativa

Una vez hecha esta breve introducción de sus características más importantes, a continuación se describirán los principales componentes de la inmunidad adaptativa, comenzando por una revisión de los principales órganos y tejidos que participan en este tipo de inmunidad, para continuar describiendo sus componentes celulares y humorales.

a. Órganos y tejidos de la inmunidad adaptativa: En el organismo existen ciertos tejidos que se encargan de regular el desarrollo y maduración de los linfocitos y que se denominan *órganos linfoides primarios* o *generadores*. El sistema inmunitario adaptativo comprende, además, una serie de órganos denominados *órganos linfoides secundarios* o *periféricos*, en los que tienden a concentrarse los linfocitos y las células presentadoras de antígeno y a donde también son conducidos los antígenos extraños, favoreciéndose así la interacción de estos antígenos con los receptores específicos frente a ellos expresados en los linfocitos e iniciándose en estos órganos las respuestas inmunitarias adaptativas frente a las agresiones.

➤ *Órganos linfoides primarios* o *generadores*: en ellos los linfocitos expresan por primera vez los receptores del antígeno y maduran fenotípica y funcionalmente. Entre estos órganos linfoides primarios destacan la médula ósea, el timo, la bolsa de Fabricio en las aves, las placas de Peyer y los complejos linfoglandulares.

La médula ósea es un órgano encargado de una serie de procesos de gran importancia, entre los que destacan la hematopoyesis (por la que se generan todas las células sanguíneas circulantes, incluidos los linfocitos inmaduros) y los primeros fenómenos de maduración de los linfocitos B en algunas especies de mamíferos, como primates y roedores, aunque en el caso del perro parece que el lugar de maduración de este tipo de células es el tejido linfoide intestinal constituido por las Placas de Peyer (Tizard 2009r). La médula ósea contiene diversos tipos celulares, entre ellos células dendríticas, macrófagos y linfocitos. Por ello, es capaz de captar agentes extraños de la sangre y, gracias a las numerosas células productoras de anticuerpos que se encuentran en ella, constituye la principal fuente de los mismos (Abbas et al. 2008c, Tizard 2009r).

El timo es un órgano que va retrayéndose con la edad aunque, incluso en animales viejos, sigue contando con cierta cantidad de tejido linfoide y es funcionalmente activo. Se trata del lugar de maduración de los linfocitos T. A su corteza llegan los linfocitos T inmaduros generados en la médula ósea, que se dividen rápidamente y sufren dos procesos de selección consecutivos, denominados “selección negativa” y “selección

positiva”, que aseguran, por una parte, que los linfocitos T maduros que abandonan este órgano no posean receptores frente a antígenos propios y, por tanto, no respondan frente a componentes normales del organismo, y, por otra parte, que sean capaces de reconocer antígenos extraños unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Sólo los linfocitos T maduros abandonan el timo para entrar en la sangre y en los tejidos linfoides secundarios (Abbas et al. 2008c, Tizard 2009r).

Las placas de Peyer son órganos linfoides localizados en la lámina propia del intestino delgado cuyas estructura y funciones varían en las diferentes especies, por lo que nos centraremos en la especie canina. En estos animales existen dos tipos de placas de Peyer: el primero de ellos forma una única estructura continua que cumple su función principal durante los primeros meses de vida, involucionando de forma temprana, mientras que el segundo tipo, mucho menos numeroso que el primero, está constituido por estructuras que perduran durante toda la vida del animal. Estos órganos linfoides contienen principalmente linfocitos B y aproximadamente un 30% de linfocitos T. Recubriendo las placas de Peyer se dispone una envoltura de tejido conjuntivo rico en células M especializadas que se encargan de trasladar ciertos antígenos desde la luz intestinal hasta estos órganos. La principal función de las placas de Peyer en el perro es similar a la que ejerce la bolsa de Fabricio en las aves, siendo un lugar de rápida proliferación de linfocitos B y en el que se produce una selección negativa de estas células, para asegurar que los linfocitos B maduros que abandonen estos órganos para pasar a la circulación, no sean reactivos frente a antígenos propios (Abbas et al. 2008c, Tizard 2009r).

Los complejos linfoglandulares son unas estructuras submucosas de tejido linfoide presentes en las paredes del intestino grueso de perros, caballos, rumiantes y cerdos. La función concreta que desempeñan es desconocida, pero se cree que pueden constituir importantes lugares de producción de anticuerpos y de captación antigénica, debido a su elevado contenido de células plasmáticas y de células M (Tizard 2009r).

➤ *Órganos linfoides secundarios o periféricos:* entre estos órganos linfoides secundarios destacan principalmente los nódulos linfáticos y el bazo, aunque también existen otros tejidos linfoides en los tractos digestivo, respiratorio y urogenital que ejercen la misma labor.

Los nódulos linfáticos son pequeños órganos redondeados o arriñonados que se interponen a lo largo de los vasos linfáticos para actuar como una especie de filtros que captan los antígenos que transporta la linfa. En ellos comenzarán las respuestas

inmunitarias adaptativas frente a los antígenos que hayan penetrado en el organismo, ya que su función consiste en facilitar las interacciones entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T y B sensibles al antígeno. Para lograrlo, poseen una estructura reticular con gran cantidad de linfocitos, células dendríticas y macrófagos, organizándose las diferentes células en una corteza, una paracorteza y una médula del nódulo gracias a la acción de determinadas citocinas (Abbas et al. 2008c, Tizard 2009r).

El bazo es un órgano de gran importancia en la puesta en funcionamiento de las respuestas de la inmunidad adaptativa que se generan frente a los antígenos que son transportados por la sangre (Abbas et al. 2008c, Tizard 2009r). Este órgano elimina partículas antigénicas, como microorganismos o restos celulares, a través de una serie de procesos de filtración de la sangre similares a los realizados por los nódulos linfáticos en la filtración de la linfa. Además, el bazo es capaz de servir de almacén de eritrocitos y plaquetas y participa en la producción de hematíes en el desarrollo fetal (Tizard 2009r). Para llevar a cabo estas acciones, el bazo contiene una serie de regiones que se encuentran repletas de linfocitos y que constituyen la denominada “pulpa blanca”, cuya función principal es la de favorecer las respuestas de la inmunidad adaptativa frente a los antígenos transportados por la sangre, al permitir la captura de dichos antígenos por parte de las células presentadoras de antígeno y su presentación posterior a los linfocitos que contiene. Además de la pulpa blanca descrita, en el bazo se distingue otra región denominada “pulpa roja” que está constituida por una gran cantidad de eritrocitos, macrófagos, células dendríticas, unos pocos linfocitos y células plasmáticas, y que se encarga principalmente de la filtración de la sangre y del almacenamiento de glóbulos rojos (Abbas et al. 2008c, Tizard 2009r).

Como se ha comentado previamente, además de los nódulos linfáticos y el bazo, existen otros órganos linfoides secundarios o periféricos, como son el sistema inmunitario cutáneo y el sistema inmunitario de las mucosas. La piel constituye una barrera física importantísima desde el punto de vista inmunitario, pero, además, contiene un sistema inmunitario especializado que participa de forma activa en la defensa del organismo y cuyas poblaciones celulares más importantes son: queratinocitos, melanocitos, células epidérmicas de Langerhans y linfocitos T intraepiteliales (Abbas et al. 2008c). Del mismo modo, en las superficies mucosas del tracto digestivo y de las vías respiratorias existen tanto células presentadoras de antígeno como linfocitos y se generan fenómenos de defensa inmunitaria ante las agresiones (Abbas et al. 2008c).

b. Componentes celulares de la inmunidad adaptativa: Los principales componentes celulares de la inmunidad adaptativa son los linfocitos. Sin embargo, es importante recordar que en la puesta en funcionamiento de las respuestas inmunitarias adaptativas resulta imprescindible la participación de las células presentadoras de antígeno, que se encargan del procesamiento y posterior exhibición de estos antígenos a los linfocitos específicos para su activación y diferenciación en las células efectoras de las respuestas adaptativas. En este apartado sólo se van a describir las principales características de los linfocitos, ya que las células presentadoras de antígeno, así como otras células que también participan en la inmunidad adaptativa, ya han sido descritas en el apartado de los componentes celulares de la inmunidad innata de esta revisión bibliográfica.

Los linfocitos son las únicas células del organismo capaces de diferenciar específicamente diversos determinantes antigénicos y son los responsables de las características de la respuesta inmunitaria adaptativa de especificidad y memoria (Abbas et al. 2008c). Aunque morfológicamente los diferentes linfocitos son indistinguibles entre sí, se han descrito varias poblaciones de estas células. En general, los tres tipos principales de linfocitos son: las células T, encargadas de la regulación de las respuestas inmunitarias adaptativas, así como del desarrollo de respuestas de base celular; las células B, responsables de la producción de anticuerpos y, por tanto, del desarrollo de respuestas adaptativas de tipo humoral; y los linfocitos citolíticos naturales o NK que, como ya se ha mencionado, desarrollan un importante papel en la inmunidad innata (Trinchieri 1989, Lunemann et al. 2009, Tizard 2009n) y son los únicos que presentan unas características morfológicas ligeramente diferentes respecto al resto de linfocitos, siendo algo mayores de tamaño y con gránulos citoplasmáticos evidentes (Tizard 2009n). Se ha descrito que el 90-95% de los linfocitos sanguíneos periféricos son linfocitos T y B y el 5-15% restante está constituido por esos linfocitos ligeramente mayores de tamaño que son en su mayoría linfocitos NK (Powell & Jenkins 1987).

Independientemente de estos tipos principales de linfocitos, se puede distinguir varias poblaciones en base a su desarrollo y a sus antecedentes de exposición a un antígeno. Todos los linfocitos son generados a partir de unas células progenitoras existentes en la médula ósea y posteriormente atraviesan una serie de fases de maduración que les llevarán a expresar sus receptores antigénicos, así como diferentes moléculas de superficie, y a adquirir sus características funcionales para convertirse en células maduras efectoras de las funciones de la inmunidad adaptativa. A modo de resumen, cabe destacar que en el perro los linfocitos B maduran parcialmente en las placas de Peyer del intestino para, a continuación, pasar a la circulación y dirigirse a los órganos linfoides secundarios para poder finalizar este proceso de maduración (Tizard 2009n). En cambio, los linfocitos T maduran en el timo y, a continuación, entran en la circulación periférica y colonizan los

tejidos periféricos. Tanto las células B como las T, una vez que han madurado pero antes de ser activadas por el contacto con el antígeno para el que son específicas, reciben el nombre de linfocitos vírgenes. Estos linfocitos vírgenes se encuentran en un estado de reposo o fase G0 del ciclo celular. En los órganos linfoides secundarios, los antígenos presentes estimulan su proliferación y diferenciación, lo que conduce a la expresión de diferentes moléculas de superficie y a la secreción de ciertas citocinas. En este momento se produce, además, el proceso denominado “expansión clonal”, que permite que se produzca una proliferación rápida de los linfocitos específicos para un microorganismo. Parte de los linfocitos T y B que han sido estimulados por un antígeno se diferencia en células efectoras, que ejercen sus funciones con el objetivo de eliminar a los agentes agresores. Otra parte de esos linfocitos estimulados se diferencia hacia células de memoria longevas, que permanecen en un estado de latencia para permitir el desarrollo de respuestas rápidas y de mayor intensidad ante siguientes exposiciones al mismo antígeno (Powell & Jenkins 1987, Clark & Kupper 2005, Abbas et al. 2008c).

Por otra parte, dentro de estas poblaciones principales de linfocitos, se distinguen varias subpoblaciones. Sin embargo la diferenciación de estas subpoblaciones en base a sus características morfológicas se encuentra dificultada debido a que poseen una estructura similar, lo que hace que sea necesario emplear diferentes moléculas de superficie a modo de marcador fenotípico para distinguir estos linfocitos. Así, se denomina “**inmunofenotipo**” al patrón de moléculas de superficie expresadas por los diferentes linfocitos (Abbas et al. 2008c, Tizard 2009n). A lo largo de la historia se han empleado diferentes marcadores antigénicos de superficie que permitían distinguir diferentes poblaciones linfocitarias. A modo de ejemplo, cabe destacar lo descrito por Raff (Raff 1971), que cita el empleo de dos de los marcadores antigénicos de superficie empleados en el ratón para tratar de distinguir y separar los linfocitos T y B ya en los años 60 y 70: el “aloantígeno theta” (θ), específico de los linfocitos timo-dependientes o linfocitos T, y el “antígeno de linfocitos B específicos de ratón” (MBLA de sus siglas en inglés, “*mouse-specific B lymphocyte antigen*”), que diferencia los linfocitos timo-independientes o linfocitos B. Con el paso del tiempo se han ido desarrollando diferentes anticuerpos monoclonales frente a antígenos o marcadores de diferenciación leucocitaria para tratar de optimizar la detección y distinción entre las diferentes subpoblaciones. En la actualidad, los anticuerpos específicos frente a dichos marcadores linfocíticos son empleados, generalmente unidos a unas sondas que pueden ser detectadas por medio de distintos métodos, para identificar y aislar las diferentes poblaciones de linfocitos. La nomenclatura aceptada para dichos marcadores linfocíticos se basa en los denominados CD o grupos de diferenciación (de sus siglas en inglés, *Cluster of Differentiation*). Cada CD se emplea para referirse a un marcador de superficie que identifica una estirpe particular o una fase de diferenciación y que resulta reconocido por un grupo de anticuerpos monoclonales. De esta

forma, con el sistema CD podemos disponer de un modo uniforme de identificación de las moléculas de superficie celular presentes en los linfocitos y otros tipos celulares del sistema inmunitario. En un principio, este sistema se empleó únicamente para denominar a los marcadores linfocíticos humanos, pero actualmente se utiliza la misma denominación CD para las moléculas homólogas de otras especies, incluido el perro (Abbas et al. 2008c). Entre las estructuras presentes en la superficie de los linfocitos, las más importantes son aquellas que forman parte de sus receptores antigénicos, pero existen otras proteínas de superficie que pueden emplearse también para la caracterización fenotípica, como ciertas proteínas transportadoras, enzimas o receptores de citocinas, anticuerpos o componentes del complemento (Tizard 2009n). Entre los anticuerpos monoclonales más frecuentemente empleados en el inmunofenotipaje tanto en la especie canina como en el hombre destacan aquellos capaces de identificar CD3, CD4 y CD8, diversas moléculas de superficie presentes en los linfocitos B (CD19, CD21, CD20, etc.), CD56 o CD25 (indicativo de activación reciente de los linfocitos T y B). Asimismo, frecuentemente se han empleado anticuerpos frente a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, tanto de clase I como de clase II.

Gracias al empleo de estas moléculas, se han podido identificar diferentes subpoblaciones de linfocitos con funciones muy diversas en la inmunidad. Así, dentro de las células T y B, se encuentran varios subconjuntos, pudiendo destacarse entre los linfocitos T los T cooperadores (Th), dentro de los que, a su vez, se describen varias subpoblaciones, y los T citotóxicos (Tc). Estas dos subpoblaciones expresan un receptor del antígeno llamado $\alpha\beta$, pero existe otro tipo de linfocitos T que expresan un receptor del antígeno constituido por las cadenas γ y δ , como son los linfocitos T intraepiteliales descritos en el apartado de componentes celulares de la inmunidad innata. En la bibliografía se puede encontrar, además, la descripción de otras subpoblaciones celulares, pero en esta revisión nos centraremos en las de mayor importancia.

➤ *Linfocitos Th*: se suelen definir como linfocitos CD3+, CD4+, CD8- y se encargan de regular las respuestas inmunitarias adaptativas mediante la estimulación de otras células inmunitarias efectoras (Saalmuller 2006). El antígeno linfocitario CD3 está presente en todos los linfocitos T, ya que se trata de un conjunto de proteínas que forman parte del receptor de antígeno de estos linfocitos (TCR) que están implicadas en la transmisión de la señal de activación desde el receptor hasta el interior celular tras la unión antigénica. El CD4 es una glucoproteína formada por una única cadena peptídica y se encuentra estrechamente asociada con el TCR. Está presente únicamente en aquellos linfocitos T que reconocen los antígenos procesados y asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMHII) de las células presentadoras de antígeno, es decir, en los linfocitos Th (Tizard 2009n). Los

diferentes linfocitos T cooperadores son capaces de segregar ciertas citocinas que interaccionan con otras células del sistema inmunitario, principalmente linfocitos B, linfocitos T citotóxicos CD8+ y macrófagos, promoviendo su activación (Abbas et al. 2008h, Corthay 2009). Por otra parte, se ha observado que las diferentes poblaciones de linfocitos Th poseen, además, ciertas propiedades supresoras, siendo capaces de inhibir la síntesis de citocinas por parte de las demás poblaciones de Th (Corthay 2009). Según el patrón de citocinas que sean producidas por estos linfocitos, se tenderá hacia la estimulación o supresión de unas células del sistema inmunitario u otras (Corthay 2009), por lo que estos linfocitos son capaces de regular así las respuestas inmunitarias desencadenadas por un antígeno y es por ello que reciben el nombre de células T cooperadoras o colaboradoras (o T *helper*, en inglés). Una serie de trabajos llevados a cabo entre los años 1977 y 1986 llevaron a varios investigadores a sugerir que dentro de la población de linfocitos Th existían, al menos, dos subpoblaciones que se diferenciaban en los patrones de secreción de citocinas (Mosmann et al. 1986, Tizard 2009k). Actualmente se considera que existen, al menos, cuatro subpoblaciones de linfocitos Th (Corthay 2009), que difieren en las citocinas que sintetizan y en sus funciones efectoras (Abbas et al. 2008h). Entre ellas, las mejor definidas son los linfocitos Th1 y Th2 y, a continuación, se van a describir brevemente sus principales características:

- Th1: los linfocitos Th1 son estimulados principalmente por células dendríticas mieloides y por los linfocitos B. Dicha estimulación se lleva a cabo mediante el empleo de la molécula de coestimulación CD80 y la secreción de IL-12 e IL-18 por parte de las células dendríticas y, una vez activados, estos linfocitos Th1 secretan IL-2, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , entre otras. Estos linfocitos intervienen principalmente en las respuestas inmunitarias de base celular y parecen regular las respuestas inmunitarias frente a microorganismos intracelulares y células cancerosas, así como las reacciones de hipersensibilidad retardadas (Street & Mosmann 1991, Mosmann & Sad 1996, Kidd 2003, Abbas et al. 2008h, Tizard 2009k). El IFN- γ producido por estas células estimula las actividades microbicidas de los fagocitos, para promover así la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados, y estimula la síntesis de IgG, que opsonizan y fijan el complemento para favorecer la fagocitosis de los microorganismos (Abbas et al. 2008h).
- Th2: los linfocitos Th2 son estimulados principalmente por células dendríticas plasmocíticas o linfoides, macrófagos y linfocitos B. En este caso, las células dendríticas secretan IL-4 para provocar la estimulación de estos linfocitos, y se emplea como señal coestimuladora aquella mediada por CD86. Los Th2 poseen

además receptores para la IL-1 secretada por macrófagos o por células dendríticas. Una vez activados, secretan principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y IL-13, que estimulan la proliferación de los linfocitos B y la secreción por parte de estos de inmunoglobulinas, especialmente IgE (Mosmann & Coffman 1989, Kunzendorf et al. 1998, Abbas et al. 2008h, Tizard 2009k). Por lo tanto, estas células se asocian con el desarrollo de respuestas inmunitarias de tipo humoral (Constant & Bottomly 1997, Abbas et al. 2008h).

- Otras subpoblaciones de linfocitos Th:

- Th0: los linfocitos Th0 son células que son capaces de producir una mezcla de citocinas características tanto de los linfocitos Th1 como de los linfocitos Th2, por lo que se ha sugerido que se trate de los precursores de ambas poblaciones o bien células en transición (Tizard 2009k, Kunzendorf et al. 1998). El proceso de diferenciación de las células Th0 se inicia por la estimulación del TCR por su ligando, pero son necesarias una serie de señales adicionales para determinar si se diferenciará hacia Th1 o hacia Th2 (Coffman & von der Weid 1997). El entorno en el que se produce la estimulación de las células Th0 por las células presentadoras de antígeno está influenciado tanto por factores genéticos como por factores relacionados con el antígeno (la forma, la dosis y la ruta de entrada) y las citocinas presentes en dicho entorno van a ser determinantes en la polarización de Th0 hacia Th1 o hacia Th2 (Constant & Bottomly 1997, Kunzendorf et al. 1998). Así, la diferenciación hacia Th1 está determinada por la producción de IL-12 e IFN- γ por parte de macrófagos y células dendríticas en respuesta al antígeno, mientras que la estimulación de las células T CD4+ vírgenes en presencia de IL-4 conduce a la diferenciación hacia Th2 (Trinchieri 1995, Coffman & von der Weid 1997).

- Th17: Estudios recientes llevados a cabo en ratón han mostrado la existencia de unos linfocitos T CD4+ denominados Th17 que se caracterizan por la secreción de IL-17 y que promueven algunas reacciones inflamatorias (Abbas et al. 2008h). Parece que la diferenciación de estos linfocitos a partir de las células T CD4+ vírgenes es estimulada por la secreción conjunta por parte de las células dendríticas de IL-6 y TGF- β o por IL-23 o IL-21, siendo inhibida, en cambio, por la presencia de IFN- γ o de IL-4, lo que indica que se trata de una población diferente de los linfocitos Th1 y Th2 (Abbas et al. 2008h, Tizard 2009k).

Su principal función está asociada con la inducción de reacciones inflamatorias, especialmente aquellas que son ricas en neutrófilos, y con enfermedades inflamatorias crónicas de mecanismo inmunitario (Abbas et al. 2008h, Tizard 2009k). Por otra parte, cabe destacar que las citocinas de la familia de la IL-17 regulan las respuestas inmunitarias frente a bacterias extracelulares y hongos y son esenciales en la regulación de las respuestas inflamatorias (Park et al. 2005, Corthay 2009, Tizard 2009k).

➤ *Linfocitos T reguladores (Treg)*: además de los linfocitos Th, se ha descrito la existencia de otras células CD3+, CD4+, CD8- que han sido denominadas “linfocitos T reguladores” y que se definen como linfocitos encargados de suprimir ciertas actividades potencialmente dañinas de los linfocitos Th, evitando así la “autoagresión” (Jonuleit & Schmitt 2003, Vigouroux et al. 2004, Corthay 2009). La principal función de estos linfocitos Treg es, por tanto, la prevención de las enfermedades autoinmunes mediante el mantenimiento de la autotolerancia inmunitaria, pero se han descrito otras funciones de estas células, entre las que destacan la supresión del asma y alergia y reacciones frente a antígenos alimentarios, la inducción de tolerancia materna frente al feto en desarrollo, la supresión de la inmunopatogenia de las enfermedades infecciosas o parasitarias, la supresión de la activación de las células T desencadenadas por estímulos débiles y el control de la magnitud de las respuestas inmunitarias mediadas por Th (Cohn 2008, Corthay 2009). Sin embargo, cabe destacar que algunos de los autores consultados cuestionan la existencia de un linaje especial de células T CD4+ dedicado en exclusiva a la supresión de los efectos de otras células, teniendo en cuenta que todos los linfocitos T CD4+, incluidos los Th “convencionales”, parecen presentar tanto actividades estimuladoras como supresoras de otras células T (Corthay 2009). Por lo tanto, estos autores sugieren que, al menos algunas de las actividades supresoras atribuidas a los linfocitos Treg, pueden ser llevadas a cabo, en realidad, por algunas poblaciones de células Th “convencionales” (Corthay 2009). Uno de los principales problemas que ha llevado a estos autores a dudar de la existencia de las células Treg como un linaje independiente es el hecho de que, por el momento, ha sido imposible encontrar un marcador linfocítico específico de esta población, habiéndose empleado marcadores que pueden expresarse en otros tipos celulares (Corthay 2009).

➤ *Linfocitos Tc*: los linfocitos T citotóxicos son células caracterizadas por el fenotipo CD3+, CD4-, CD8+ que se encargan de eliminar las células infectadas o dañadas que expresan antígenos endógenos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (Abbas et al. 2008h). Estas células Tc se relacionan estrechamente con las respuestas inmunitarias adaptativas desarrolladas frente a microorganismos intracelulares. Para su activación precisan, además de la presentación

del antígeno para el que son específicas, de otras señales coestimuladoras provenientes de las células presentadoras de antígeno o de los linfocitos Th (Abbas et al. 2008h). El marcador CD8 sólo se encuentra en los linfocitos Tc y no en los Th, ya que forma parte del receptor para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Una vez que los linfocitos T CD8⁺ activados reconocen un complejo antígeno-complejo mayor de histocompatibilidad de clase I expresado en otra célula y se estimula su TCR, procederán a la destrucción de la célula diana (Tizard 2009t). La forma en la que la célula diana será destruida puede variar, ya que se han descrito, al menos, tres vías de citotoxicidad diferentes que pueden desarrollar los Tc, dos de ellas mediante el contacto directo entre el linfocito y la célula dañada y la otra mediante la secreción de citocinas (Andersen et al. 2006). El mecanismo efector de citotoxicidad de mayor importancia es uno de los que se encuentran mediados por el contacto directo célula-célula e implica la liberación al espacio intercelular confinado entre las membranas plasmáticas del linfocito Tc y la célula diana (anillo sináptico) de las proteínas citotóxicas contenidas en el interior de los gránulos citoplásmicos del linfocito Tc (Andersen et al. 2006, Williams & Bevan 2007, Abbas et al. 2008h). Dichas proteínas, entre las que destacan la perforina y algunas granzimas, inducen la apoptosis de la célula diana, pero no del linfocito Tc ni de otras células vecinas (Andersen et al. 2006). Los linfocitos Tc son capaces de emplear otro mecanismo de destrucción mediado por interacciones de las moléculas de membrana de los linfocitos con las de las células diana. En este caso, la activación linfocitaria induce la expresión en su superficie de la proteína denominada ligando de Fas (FasL, CD178), que se une a continuación con el receptor de muerte celular Fas (CD95 o Apo-1), que se encuentra presente en muchos tipos celulares, lo que conduce a la apoptosis de la célula diana por la vía clásica de las caspasas (Andersen et al. 2006, Abbas et al. 2008h). El tercer mecanismo de citotoxicidad que han desarrollado los linfocitos Tc se encuentra mediado por citocinas, principalmente TNF- α e IFN- γ (Andersen et al. 2006, Williams & Bevan 2007). El TNF- α liberado por los Tc activados desencadena en la célula diana la cascada de las caspasas y, por tanto, la apoptosis. En el caso del IFN- γ , se incrementa el procesamiento y presentación de antígenos mediante el incremento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I en la célula diana (Andersen et al. 2006). Por otra parte, al igual que se ha descrito en el caso de los linfocitos Th, los linfocitos Tc pueden dividirse en dos subpoblaciones principales (Tc1 y Tc2) en función de las citocinas que sintetizan: las células Tc1 secretan IL-2, IFN- γ y TNF- α y constituyen la población más numerosa de linfocitos Tc, mientras que las células Tc2 secretan IL-4 e IL-5 y su número es mucho menor debido, principalmente, al hecho de que para que se produzca la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ hacia Tc2 es necesario que exista una concentración muy elevada de IL-4 (Seder et al. 1992). También existe una tercera subpoblación (Tc0) que puede

considerarse equivalente a la subpoblación de linfocitos Th0 ya que posee un perfil de citocinas no restringido (Tizard 2009t).

➤ *Linfocitos B*: los linfocitos B se definen fenotípicamente como linfocitos CD3- y positivos a la expresión de alguna de las moléculas de superficie que se han empleado para su caracterización. Entre los marcadores de superficie de los linfocitos B utilizados en la actualidad en la caracterización linfocitaria canina destacan CD79 α (Faldyna et al. 2001, Comazzi et al. 2006, Sinkora et al. 2007), IgM de superficie (Wilkerson et al. 2005) y CD21 (Faldyna et al. 2001, Sakai et al. 2003, Wilkerson et al. 2005, Breathnach et al. 2005, Comazzi et al. 2006). CD79 α constituye la porción encargada de la transducción de señales del receptor de las células B y abarca las regiones transmembrana e intracitoplásmica de dicho receptor. Se expresa, por tanto, en todas las células B, tanto maduras como inmaduras (Chu & Arber 2001), mientras que la IgM de superficie forma parte del receptor de estas células en su estado inmaduro (Wilkerson et al. 2005). CD21 es el receptor de los linfocitos B para C3d y se denomina comúnmente “receptor del complemento de tipo 2” (CR2). Este receptor se expresa en los linfocitos B maduros en forma de complejo con otras dos proteínas de membrana, CD19 y CD81, formando el “complejo del correceptor de los linfocitos B”, cuya activación conduce a una amplificación importantísima de la respuesta de los linfocitos B tras la estimulación antigénica (Wilkerson et al. 2005, Abbas et al. 2008a, Tizard 2009e). Estos linfocitos son los principales responsables de las respuestas inmunitarias humorales, siendo los encargados de la síntesis de anticuerpos. En general, estas células son capaces de reconocer los antígenos directamente a través de su receptor antigénico (BCR), pero para que se produzca una activación efectiva es necesaria la existencia de una segunda señal de una célula Th activada, una cooperación entre los B y T específicos de antígeno, además de otra serie de señales coestimuladoras (Saalmuller 2006, Abbas et al. 2008a). Sin embargo, ciertos antígenos no proteínicos, principalmente polisacáridos y lípidos, son capaces por sí solos de inducir respuestas en los linfocitos B, estimulando la síntesis de anticuerpos sin la ayuda de los linfocitos Th, y estos antígenos y las respuestas que ocasionan se denominan “independientes del timo” o “independientes de los linfocitos T” (Abbas et al. 2008a). En cualquier caso, cuando un antígeno específico se une al receptor del antígeno del linfocito B (BCR) en presencia de una serie de señales coestimuladoras adecuadas, se estimula la entrada de este linfocito, que previamente estaba en reposo, en la fase G1 del ciclo celular, lo que se acompaña de una serie de cambios que conducen a la división y diferenciación del linfocito B. Entre estos cambios destacan un incremento del tamaño celular, del ARN citoplásmico, de los orgánulos biosintéticos celulares, así como un importante aumento en la expresión de receptores de citocinas, CMHII, BCR, IgM y coestimuladores (CD86 y CD80) (Abbas et al.

2008a, Tizard 2009e). Una fracción de los linfocitos B activados se diferenciará hacia células plasmáticas, que se distribuirán por todo el organismo, pero especialmente en el bazo, en la médula de los nódulos linfáticos y en la médula ósea, lugares donde darán lugar a la síntesis de grandes cantidades de inmunoglobulinas de especificidad idéntica a la del BCR de su linfocito B progenitor (Tizard 2009e). Otra fracción de los linfocitos B que han sido estimulados por su antígeno específico se diferenciarán hacia células de memoria, que permanecen en la corteza de los nódulos linfáticos, proliferan y forman centros germinales (Tizard 2009e). Por otra parte, cabe destacar que, a pesar de que la población de linfocitos B parece ser más homogénea que la de linfocitos T, en el hombre y varias especies animales se ha descrito la existencia de dos subpoblaciones de estos linfocitos que se denominan linfocitos B1 y B2. Los B-B2 son los linfocitos B convencionales, los que se encargan de las respuestas inmunitarias humorales, y son los predominantes. Los linfocitos B-B1 dan lugar a células productoras de IgA (Tizard 2009e) o IgM (Abbas et al. 2008a) en intestino y participan de alguna forma en las respuestas innatas, como se describió previamente.

c. Componentes humorales de la inmunidad adaptativa: entre los componentes humorales de la inmunidad adaptativa destacan de manera especial los anticuerpos, que son producidos por los linfocitos B y células plasmáticas derivadas de ellos tras su estimulación antigénica y de los que a continuación describiremos las características de mayor relevancia. Sin embargo, el sistema del complemento (Nielsen & Leslie 2002) y diferentes péptidos antimicrobianos, como las defensinas y catelicidinas (Oppenheim et al. 2003), ejercen también una importante labor en la puesta en funcionamiento de las respuestas adaptativas. Asimismo, algunas citocinas ya descritas no sólo participan en la inmunidad innata, sino que también juegan un papel central en las respuestas adaptativas y son sintetizadas por células de esta rama de la inmunidad. Entre ellas cabe destacar el TNF- α , el IFN- γ , la IL-10 y la IL-6. Otras citocinas ejercen sus funciones principales en el seno de las respuestas inmunitarias adaptativas y a continuación describiremos las principales características de las más importantes para pasar luego a la descripción de los anticuerpos.

➤ *Citocinas de la inmunidad adaptativa*: de la misma forma que se ha descrito para las citocinas que participan en las respuestas innatas, las citocinas de la inmunidad adaptativa permiten que exista una comunicación entre las células que intervienen en ella. Se encargan de mediar la proliferación y la diferenciación de los linfocitos tras el reconocimiento antigénico y de la activación de las células efectoras (Abbas et al. 2008d). Entre las citocinas que actúan como mediadoras de las respuestas adaptativas destacan: IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, TNF- β , IL-17 e IL-21.

- **IL-2:** esta citocina es una glucoproteína de 14 a 17 kD cuya estructura contiene cuatro hélices α . La IL-2 fue descrita inicialmente como un factor de crecimiento de las células T, es sintetizada principalmente por los linfocitos Th CD4+ tras su activación y actúa de forma autocrina y paracrina (Gemmell & Seymour 1994, Abbas et al. 2008d). Su síntesis es transitoria, llegando a un pico de secreción a las 8-12 horas tras la estimulación de los linfocitos. Dicha secreción se concentra en la sinapsis entre el linfocito y la célula presentadora de antígeno, donde también se concentran los receptores de IL-2 de dicho linfocito, lo que favorece el contacto necesario para que se inicien las respuestas correspondientes (Abbas et al. 2008d). Entre las funciones de esta citocina destacan la estimulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación de los linfocitos T activados por el antígeno. Asimismo, aumenta la síntesis de IFN- γ e IL-4 por parte de los linfocitos T (Abbas et al. 2008d) y estimula la citotoxicidad de las células NK y Tc (Gemmell & Seymour 1994). Por otra parte, esta citocina actúa como un factor de crecimiento para las células B e induce un incremento en la secreción de inmunoglobulinas (Abbas et al. 2008d). La IL-2 es también necesaria para la supervivencia de los linfocitos Treg y parece influir en su función (Abbas et al. 2008d).
- **IL-4:** la IL-4 es también un miembro de la familia de las citocinas con cuatro hélices α y es producida por linfocitos T CD4+ pertenecientes a la subpoblación Th2, mastocitos y basófilos (Gemmell & Seymour 1994, Abbas et al. 2008d). Se encarga de estimular la producción de anticuerpos IgE, al ser la principal citocina que promueve el cambio de clase de la cadena pesada de la inmunoglobulina de los linfocitos B al isotipo IgE. Además, es un importante factor en la expansión clonal de las células B específicas de antígeno y estimula el desarrollo de los linfocitos Th2 a partir de los linfocitos TCD4+ vírgenes (Abbas et al. 2008d). Por el contrario, inhibe el desarrollo de los linfocitos Th1 y Th17 (Abbas et al. 2008d). Todo ello parece sugerir que la IL-4 es un modulador de las respuestas humorales frente a diferentes estímulos antigénicos (Gemmell & Seymour 1994). Por otra parte, la IL-4 disminuye los receptores para la IL-2, inhibiendo así sus funciones, y es capaz de bloquear la generación de óxido nítrico por parte de los macrófagos, que es necesario para la destrucción de los microorganismos intracelulares (Gemmell & Seymour 1994). Muchas de sus funciones son inhibidas por el IFN- γ y, a su vez, la IL-4 inhibe muchas de las funciones del IFN- γ (Abbas et al. 2008d).
- **IL-5:** la IL-5 está constituida por un homodímero que contiene un dominio de cuatro hélices α y es sintetizada, al igual que la anterior, por los linfocitos Th2 y

por los mastocitos activados (Abbas et al. 2008d). Se trata de una citocina con una potente labor de estimulación para el crecimiento y diferenciación de los eosinófilos (Abbas et al. 2008d). Por otra parte, la IL-5 actúa sobre los linfocitos B y estimula la síntesis de IgA e IgM (Gemmell & Seymour 1994, Abbas et al. 2008d).

- IL-13: la IL-13 pertenece también al grupo de citocinas con cuatro hélices α y posee una estructura similar a la IL-4, compartiendo con ella muchas funciones biológicas. Es sintetizada principalmente por los linfocitos Th2, pero también los linfocitos Tc, las células NK, los basófilos y los eosinófilos pueden sintetizarla (Gemmell & Seymour 1994, Abbas et al. 2008d). La IL-13 es secretada de forma temprana tras la estimulación y durante largos períodos, lo que la diferencia de la IL-4, que es sintetizada de forma tardía y de modo transitorio (Zurawski & de Vries 1994). En cuanto a sus efectos, destaca su acción junto con la IL-4 en la defensa frente a los parásitos helmintos y en las enfermedades alérgicas (Abbas et al. 2008d) y, al igual que la IL-4, induce el cambio de clase a IgE en los linfocitos B (Gemmell & Seymour 1994, Abbas et al. 2008d). Por otra parte, inhibe la actividad citotóxica de los monocitos y macrófagos y, por tanto, su capacidad de destruir los microorganismos intracelulares (Gemmell & Seymour 1994). También estimula a los fibroblastos y a los macrófagos para que sintetizen colágeno en la reparación tisular en inflamaciones crónicas y actúa sobre la proliferación, diferenciación y función secretora de moco de las células caliciformes epiteliales bronquiales (Abbas et al. 2008d).

- TNF- β : el TNF- β es una citocina sintetizada principalmente por los linfocitos T que comparte muchas características estructurales y funcionales con el TNF- α y que a menudo es denominada linfotóxina (LT). Se trata de un mediador de la inflamación aguda y actúa a nivel local. Se encarga de activar a las células endoteliales y a los neutrófilos (Abbas et al. 2008d).

- IL-17: la IL-17 incluye realmente una familia de seis citocinas relacionadas estructuralmente que son sintetizadas por una subpoblación de linfocitos TCD4+ diferentes de los Th1 y Th2. Estimulan la producción de neutrófilos por la médula ósea y la síntesis de IL-1 y quimiocinas por parte de las células endoteliales y los macrófagos para favorecer la atracción de neutrófilos (Abbas et al. 2008d).

- IL-21: esta citocina también es sintetizada por los linfocitos T CD4+ activados. Se encarga de estimular a los linfocitos T CD8+ y células NK y el

cambio de clase y la síntesis de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B (Abbas et al. 2008d).

➤ *Anticuerpos*: las moléculas de anticuerpo son glucoproteínas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas (Ig) y son los principales mediadores de la inmunidad humoral. Estas moléculas pueden expresarse unidas a la membrana celular de los linfocitos B actuando como su receptor para el antígeno (BCR), o en forma secretada por estos mismos linfocitos, encontrándose en el plasma, en las secreciones mucosas y en el líquido intersticial de los tejidos, donde se unen a sus antígenos específicos para iniciar sus funciones efectoras (Abbas et al. 2008b, Tizard 2009c). Esta forma secretada soluble es la que se denomina realmente “inmunoglobulina”, empleándose el término BCR (o receptor del antígeno del linfocito B) para hablar de la forma expresada en la superficie celular (Tizard 2009c). Los linfocitos B en sus diferentes estados de maduración son las únicas células capaces de sintetizar anticuerpos. Así, los linfocitos B inmaduros expresan genes para moléculas de inmunoglobulinas, pero producen sólo pequeñas cantidades de estas proteínas, muchas de ellas en forma de receptor de membrana (IgM, principalmente). Sin embargo, una vez producido el reconocimiento antigénico, estos linfocitos B son estimulados y comienza su diferenciación hacia células plasmáticas, que son las responsables de la síntesis de la mayor parte de los anticuerpos (Askonas 1975). Todas las moléculas de anticuerpo comparten una serie de características estructurales básicas, pero son muy variables en las regiones que se unen al antígeno, que son las que les confieren su especificidad. Sus funciones efectoras y propiedades físico-químicas se relacionan con las porciones del anticuerpo que no se unen al antígeno y que son mucho menos variables. Cada molécula de anticuerpo tiene una estructura básica simétrica compuesta por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, que constan de regiones variables amino terminales (V) que se encargan del reconocimiento antigénico, y regiones constantes carboxi terminales (C), que son las que median las funciones efectoras y que determinan el isotipo del anticuerpo (Casadevall & Pirofski 2004, Abbas et al. 2008b). Por tanto, las regiones variables se unen a los antígenos, mientras que las regiones constantes se unen a los receptores celulares y a algunos componentes humorales del sistema inmunitario, como el complemento (Casadevall & Pirofski 2004). Existen diferentes clases (isotipos) y subclases de anticuerpos en función de las diferencias en la estructura de sus regiones constantes de la cadena pesada. Dichas diferencias son las que determinan las funciones efectoras que desempeñarán. Estos isotipos se denominan IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. La especie canina posee IgA, IgD, IgE (que parece que posee dos subclases, IgE1 e IgE2), cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM. Durante la respuesta inmunitaria, las clases de inmunoglobulinas que son secretadas cambian (cambio de isotipo): el tipo de región

constante y, por tanto, el isotipo, de las inmunoglobulinas sintetizadas por el clon de linfocitos B estimulado por un antígeno se modifica, pero no las regiones variables, por lo que la especificidad no cambia. Como resultado, los linfocitos B que en origen sintetizaban IgM e IgD pueden dar lugar a isotipos y subtipos diferentes con mayor capacidad para eliminar ese antígeno en concreto. Así, la respuesta humoral frente a la mayoría de bacterias y virus está mediada principalmente por IgG, que favorece su fagocitosis (Abbas et al. 2008b, Tizard 2009c). Entre las funciones de los diferentes tipos de anticuerpos que se describieron inicialmente se incluyen funciones directas, como neutralización de toxinas y virus, y funciones indirectas, que requieren la participación de otros componentes del sistema inmunitario, como la opsonización o la activación del complemento (Kozel et al. 2004). Sin embargo, el número de funciones que ejercen los anticuerpos en la puesta en funcionamiento de las respuestas inmunitarias se ha ido ampliando, destacando entre estas funciones efectoras la estimulación de la citotoxicidad celular, sus actividades como mediadores de la inflamación y de las respuestas inmunitarias de base celular y su capacidad para actuar en ciertos casos como agentes bacteriostáticos o bactericidas directos (Casadevall & Pirofski 2004). Por otra parte, es importante tener en cuenta que la eficacia de las respuestas inmunitarias adaptativas humorales es el resultado de la suma de las eficacias de las diversas moléculas de anticuerpos sintetizadas en el hospedador (Casadevall & Pirofski 2004).

2.1.2.2. Reconocimiento antigénico de la inmunidad adaptativa

Todos estos componentes del sistema inmunitario adaptativo sólo comenzarán a ejercer sus funciones una vez que se haya producido el reconocimiento antigénico. El sistema inmunitario adaptativo puede reconocer y responder a una amplia variedad de estructuras moleculares no propias que se denominan antígenos (Tizard 2009d) que pueden ser tanto ligandos altamente conservados entre los diferentes patógenos como ligandos no conservados, presentes en unos pocos microorganismos (Borghesi & Milcarek 2007). Las moléculas antigénicas, para ser reconocidas por los receptores del sistema inmunitario adaptativo, deben ser capturadas, procesadas y presentadas por las células presentadoras de antígeno ya descritas a las células efectoras de las respuestas adaptativas (Tizard 2009d). Los receptores antigénicos son generados somáticamente en procesos aleatorios de reorganización génica y son distribuidos clonalmente en los diferentes linfocitos T y B. Como consecuencia, la funcionalidad del sistema inmunitario adaptativo se basa en la habilidad para generar un amplio espectro de receptores con especificidades particulares (Medzhitov & Janeway 1998). Estos receptores para el antígeno de los linfocitos T y B se denominan de forma abreviada TCR y BCR, respectivamente, y son estructuras proteicas

complejas en las que ciertas porciones se encargan de la unión al antígeno y otras de la transducción de las señales de activación (Tizard 2009n). Por otra parte, los BCR poseen la particularidad de que son liberados de la célula, pasando a la sangre y a otros fluidos del organismo, donde se denominan anticuerpos (Tizard 2009n).

Para que se produzca la activación de los linfocitos es necesario que los receptores antigénicos reconozcan los ligandos para los que son específicos pero, además, es preciso que participe una segunda señal coestimuladora proveniente de la célula presentadora de antígeno. Esto hace que, en general, el reconocimiento inmunitario adaptativo en ausencia de reconocimiento innato dé como resultado la inactivación clonal de aquellos linfocitos que expresen los receptores implicados en ese evento de reconocimiento (Medzhitov & Janeway 1998).

Las moléculas antigénicas deben ser fraccionadas en el interior de las células y los fragmentos resultantes deben unirse a los receptores apropiados para la presentación del antígeno, que son denominados “moléculas de histocompatibilidad”. Estas moléculas son glucoproteínas codificadas por genes localizados en el locus denominado “complejo mayor de histocompatibilidad” (CMH) dentro del cual podemos diferenciar tres clases: las moléculas del CMH de clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas del organismo; las moléculas del CMH de clase II se localizan sólo en las células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) y, en el perro, en casi todos los linfocitos T adultos; y las moléculas del CMH de clase III poseen funciones diversas, muchas de ellas asociadas con la inmunidad innata (Tizard 2009p). Mientras que los linfocitos B y sus anticuerpos son capaces de reconocer antígenos tanto solubles como asociados a células, los linfocitos T sólo son capaces de reconocer antígenos presentados en otras células a través de estas moléculas del CMH (Monaco 1995, Abbas et al. 2008e). Las moléculas de clase I presentan péptidos a los linfocitos Tc (CD8+) y, en general, dichos péptidos derivan de proteínas endógenas o citosólicas, como proteínas víricas o bacterianas presentes en células infectadas por microorganismos intracelulares o proteínas extrañas de células tumorales (Monaco 1995, Abbas et al. 2008e). Por el contrario, las moléculas de clase II presentan péptidos derivados de proteínas halladas en el medio extracelular o que forman parte de dominios extracelulares de proteínas de superficie celular a los linfocitos Th (CD4+) (Monaco 1995, Abbas et al. 2008e). Una vez producido el reconocimiento del complejo formado por el antígeno específico junto con la molécula del CMH correspondiente, se inician los procesos que conducen hacia la puesta en funcionamiento de las funciones efectoras de los linfocitos T.

Al igual que lo descrito para los linfocitos T, los linfocitos B requieren de varias señales para su activación completa: por una parte, como es evidente, será imprescindible que se produzca la unión del antígeno con el BCR, y, por otra parte, el linfocito B necesita una coestimulación proveniente de los linfocitos Th que, a su vez, han recibido una coestimulación por parte de las células presentadoras de antígeno (Tizard 2009e). Sin embargo, como se comentó previamente, existen ciertos antígenos, por lo general polímeros repetitivos simples, que son capaces de estimular la síntesis de anticuerpos por parte de los linfocitos B en ausencia de la señal coestimuladora de los linfocitos Th. Estos antígenos se denominan T-independientes, son capaces de proporcionar una señal suficiente para la proliferación de los linfocitos B e inducen la síntesis de IgM, pero no son capaces de inducir células de memoria (Tizard 2009e).

2.2. CITOMETRÍA DE FLUJO

2.2.1. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

En el ámbito clínico y de la investigación las respuestas inmunitarias desencadenadas ante una agresión pueden cobrar importancia tanto desde un punto de vista diagnóstico como desde un punto de vista terapéutico y como indicador pronóstico. Así, el estudio del inmunofenotipo, o caracterización de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en base al patrón de moléculas de superficie expresadas, puede emplearse para tratar de determinar el tipo de respuesta inmunitaria desarrollada ante una enfermedad y poder así evaluar el pronóstico en cada caso en concreto. Asimismo, puede emplearse para evaluar las alteraciones producidas en el curso de enfermedades autoinmunes o con base inmunomediada o para evaluar el efecto que sobre el sistema inmunitario pueden tener diversos estímulos.

En el estudio de las respuestas inmunitarias pueden emplearse diversos métodos que no sólo estarán encaminados al inmunofenotipaje. Muchas técnicas de laboratorio habitualmente empleadas en el campo de la inmunología están basadas en la producción y/o detección de anticuerpos (Abbas et al. 2008k, Tizard 2009m). La elevada especificidad de los anticuerpos por un antígeno concreto hace que sean un reactivo perfecto para su detección, purificación y cuantificación (Abbas et al. 2008k). Así, los anticuerpos pueden emplearse en el diagnóstico de una enfermedad de dos formas: en primer lugar, es posible determinar si una animal ha estado expuesto previamente a un agente infeccioso mediante la detección de anticuerpos específicos en su suero; y, en segundo lugar, pueden utilizarse anticuerpos específicos para detectar o identificar un antígeno de interés, tanto asociado a un agente infeccioso como a las células del animal (Tizard 2009m).

Los métodos inmunológicos empleados para cuantificar la concentración de los antígenos o los anticuerpos son de elevada especificidad y sensibilidad y entre ellos destacan las pruebas de unión primaria, que se realizan midiendo los inmunocomplejos que se forman al permitir que el antígeno y el anticuerpo se combinen (Abbas et al. 2008k, Tizard 2009m). Esto requiere el marcaje de uno de los reactivos, bien con radioisótopos (como en el radioinmunoanálisis o RIA), con enzimas (como en el enzimoimmunoanálisis de adsorción o ELISA) o con colorantes fluorescentes o fluorocromos (como en las pruebas de inmunofluorescencia directas e indirectas). Además de las pruebas de unión primarias, pueden emplearse otras técnicas serológicas denominadas de unión secundaria,

que permiten evaluar *in vitro* el resultado de esa interacción antígeno-anticuerpo, como la precipitación de inmunocomplejos, la aglutinación de anticuerpos unidos a antígenos particulados o la lisis celular inducida por la activación de la vía clásica del complemento (Tizard 2009m).

Por otra parte, con frecuencia se emplean anticuerpos que son específicos frente a los antígenos expresados o contenidos en un tipo celular concreto con el objetivo de identificar estas células en los tejidos o en las suspensiones celulares y de separarlas a partir de las poblaciones mixtas (Abbas et al. 2008k). Estos anticuerpos son con frecuencia anticuerpos monoclonales puros y específicos derivados de un hibridoma que pueden emplearse como reactivos químicos estandarizados y pueden obtenerse en cantidades casi ilimitadas (Tizard 2009m). Una de las aplicaciones más destacadas de estos anticuerpos monoclonales es la citometría de flujo, técnica que analiza propiedades de las células o partículas en suspensión en un flujo continuo, empleada con frecuencia en el inmunofenotipaje y en la que nos centraremos a continuación en esta revisión bibliográfica.

Además, se han desarrollado otros métodos que evalúan las respuestas de los linfocitos T y B mediante técnicas laboratoriales que han permitido obtener importantes avances en los conocimientos sobre el sistema inmunitario. Así, se emplean activadores policlonales de linfocitos T, como concanavalina A y fitohemaglutinina, para evaluar la capacidad de activación de los linfocitos T aislados a partir de sangre. En el caso de los linfocitos B suelen emplearse como análogos de los antígenos anticuerpos anti-Ig que se unen a la región constante de las Ig de la membrana de estos linfocitos para activarlos. También puede evaluarse la capacidad proliferativa de estas células mediante la determinación de la cantidad de timidina que queda incorporada al ADN de las células cultivadas en su replicación, ya que el ritmo de división celular suele ser directamente proporcional a la velocidad de síntesis del ADN. Otras técnicas permiten evaluar la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T y la síntesis de anticuerpos por parte de los linfocitos B (Abbas et al. 2008k).

Otra técnica que ha ayudado a la comprensión de diversas enfermedades es el empleo de ratones transgénicos en los que se expresa de forma aumentada un gen en concreto en un tejido determinado o ratones con genes inactivados (*knockout*) en los que se ha anulado el funcionamiento de un gen en particular (Abbas et al. 2008k). En concreto, estos ratones *knockout* se han utilizado en diversos estudios llevados a cabo en la infección por *Ehrlichia* spp. para tratar de dilucidar los mecanismos implicados en la respuesta inmunitaria desencadenada, así como los mecanismos de evasión de estas respuestas y la inmunopatogenia de la enfermedad (Akkoyunlu & Fikrig 2000, Ganta et al. 2002, Feng &

Walker 2004, Bitsaktsis et al. 2004, Yager et al. 2005, Bitsaktsis & Winslow 2006, Ismail et al. 2006, Ismail et al. 2007).

2.2.2. FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La primera descripción de un citómetro de flujo data de 1934 y se sugería la posibilidad de llevar a cabo recuentos celulares al hacer fluir a dichas células por un tubo capilar mientras se empleaba un sensor fotoeléctrico para hacer las mediciones. Posteriormente, en 1947 Gucker y colaboradores describieron la detección por citometría de flujo de bacterias en aerosoles (Gucker & O'Konski 1947). Este trabajo se desarrolló durante la Segunda Guerra Mundial en un intento de identificar de forma rápida la presencia de bacterias y esporas transmitidas por el aire que podían ser empleadas como armas biológicas. Los primeros citómetros de flujo disponibles comercialmente datan de 1970. En la actualidad, la citometría de flujo constituye una valiosa técnica laboratorial que se emplea en la rutina diaria de muchos laboratorios clínicos y de investigación y que permite caracterizar a elevada velocidad poblaciones celulares heterogéneas a través de la identificación simultánea de un amplio rango de propiedades biológicas (Shapiro 2003b).

La citometría es un proceso en el que se miden características físicas y/o químicas de las células o, por extensión, de otras partículas biológicas o no biológicas. La citometría de flujo permite analizar electrónicamente las señales generadas por células individuales u otras partículas en suspensión a medida que van pasando por una fuente de luz en el aparato de medida, el citómetro de flujo (Shapiro 2003b). Algunas de las aplicaciones más frecuentes de la citometría de flujo están directamente relacionadas con la evaluación de las respuestas inmunitarias y con el inmunofenotipaje, como veremos más adelante. La velocidad de análisis puede ser mayor a miles de células por segundo y las células individuales procedentes de subpoblaciones heterogéneas pueden ser no sólo identificadas sino también separadas físicamente en base a sus propiedades. Esta separación de las células permite emplearlas posteriormente para nuevos estudios físicos, químicos, biológicos o moleculares y es llevada a cabo por ciertos citómetros de flujo, los denominados “*sorters*” (Herrera et al. 2007).

En el citómetro de flujo, las células en suspensión son inyectadas en un fluido que las alinea individualmente y, por tanto, hace que pasen de una en una. A continuación se dirige un haz de luz a este flujo de células y se valora para cada una de ellas las características de dispersión de luz y emisión de fluorescencia. Dichas características serán recogidas, filtradas y convertidas en valores digitales que son almacenados en un ordenador para su posterior interpretación.

Los parámetros que podrán ser recogidos de cada una de las células analizadas en un citómetro de flujo son parámetros relacionados con sus características intrínsecas, como su tamaño o la complejidad de su núcleo y citoplasma, y parámetros relacionados con las características antigénicas o funcionales de cada célula, que vienen determinadas por la expresión de las moléculas para las que son específicas las sondas empleadas en cada caso y que nos servirán de ayuda en el inmunofenotipaje.

Por lo tanto, las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos: señales de dispersión de la luz y señales de fluorescencia.

- Las características de dispersión de luz de una célula se relacionan con las propiedades específicas de tamaño celular y complejidad, que se relacionan a su vez con las propiedades de reflexión y refracción de la luz. Son el resultado de la interacción de la luz con una partícula, que produce un cambio de dirección, pero no de longitud de onda, en todas las direcciones del espacio. El citómetro de flujo mide a través de fotodetectores la dispersión frontal o “*forward light scatter*” (FSC), que se corresponde con la luz dispersada en un ángulo pequeño que casi coincide con la dirección de la luz incidente, y la dispersión lateral o “*side light scatter*” (SSC) de la luz para cada una de las células, que se corresponde con la luz dispersada en un ángulo de 90° respecto a la luz incidente (Shapiro 2003b). La intensidad de la dispersión frontal de la luz depende de la diferencia del índice de refracción entre la partícula y el medio, así como del tamaño de la partícula, lo que conduce a que este valor sea proporcional al tamaño, forma y homogeneidad óptica de la célula, influyendo en mayor medida las propiedades de tamaño y superficie de la célula. Así, en general, el valor de FSC de una célula grande será mayor que el de una célula pequeña, aunque no debe olvidarse la participación de otros factores en este parámetro. Por su parte, la intensidad de la dispersión lateral de la luz se encuentra influenciada por diversas propiedades, pero, en general, se puede asumir que es proporcional a la complejidad celular. De esta forma, las células con una elevada complejidad, o, dicho de otra forma, con una estructura interna granular, como los granulocitos sanguíneos, mostrarán un valor de SSC mayor que aquellas células que carezcan de gránulos en su citoplasma, como los linfocitos (Shapiro 2003b). En resumen y de forma general, la FSC de un haz de luz se puede usar para medir el tamaño de la célula y la SSC proporciona una medida de la rugosidad de la superficie celular y de su complejidad interna y, mediante la combinación de estos dos parámetros, se pueden identificar las diferentes poblaciones leucocitarias en una muestra sanguínea (Tizard 2009m).

- Sin embargo, el citómetro de flujo suele emplearse para algo más que determinar el tamaño y complejidad de las células. Es posible determinar la estirpe tisular, la etapa madurativa o el estado de activación que presenta una célula analizando la expresión de diferentes moléculas en su superficie o en su interior. Para llevar a cabo esta identificación pueden emplearse una serie de sondas específicas (o anticuerpos monoclonales) frente a dichas moléculas (o antígenos). Estas sondas son marcadas con sustancias que emiten fluorescencia cuando son excitadas a una determinada longitud de onda y el citómetro de flujo es capaz de detectar la fluorescencia procedente de las células en suspensión y determinar así el número de ellas que expresan la molécula a la que se encuentra unida la sonda fluorescente (Shapiro 2003b, Abbas et al. 2008k). Las sustancias que se emplean por sus características de emisión de fluorescencia son los denominados “fluorocromos”. Cada fluorocromo posee un espectro de absorción o excitación, que es el rango de longitud de onda en el que absorbe luz, y un espectro de emisión, que es el rango sobre el que el fluorocromo emite luz. Cuando el fluorocromo interacciona con la luz de excitación, procedente del láser del citómetro, parte de esa energía se absorberá y el resto será emitida en forma de luz a una longitud de onda superior (debido a que esa luz emitida es de menor energía que la que provocó la excitación). Los citómetros de flujo detectan esas señales de fluorescencia procedentes de los complejos antígeno-anticuerpo (o “molécula problema”-sonda) marcados con un fluorocromo y situados en una célula (Shapiro 2003b). El empleo de un fluorocromo u otro está condicionada por el tipo de láser (o láseres) de los que disponga el citómetro de flujo que se vaya a emplear, ya que si éste emite un haz de luz a 488 nm, los fluorocromos empleados deben poseer un espectro de absorción lo más cercano posible a ese espectro de emisión del láser. Además, si se utiliza más de un fluorocromo a la vez, las longitudes de onda a las que emitan deben ser lo más lejanas posibles, para que no interfieran las señales de uno y otro. En la actualidad existen multitud de fluorocromos en el mercado que pueden ser empleados en citometría de flujo. Algunos de los más utilizados son: isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se excita a 490 nm y emite a 514 nm; ficoeritrina (PE), que se excita a partir de 480 nm (con un máximo de excitación a 565 nm) y emite a 578 nm; rojo Texas, que se excita a 596 nm y emite a 615 nm; alofococianina (APC), que se excita a 635 nm y emite a 660 nm; ioduro de propidio (IP), que se excita a 480 nm y emite a 510 nm y que suele emplearse para marcar ácidos nucleicos (Shapiro 2003c).

2.2.3. COMPONENTES DE LOS CITÓMETROS DE FLUJO

A modo de resumen y para favorecer la comprensión de los componentes estructurales de los citómetros de flujo, podemos decir que la citometría de flujo es una técnica laboratorial de análisis multiparamétrico que se basa en hacer pasar una suspensión de partículas, que son por lo general células, alineadas y de una en una por delante de un haz de luz láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes características de la célula y que son recogidos por diferentes detectores. Estos detectores convierten dichas señales en señales eléctricas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros de una misma célula.

Estas características hacen que sean necesarios para el funcionamiento de un citómetro de flujo unos sistemas de fluidos, que se encargan de transportar (o inyectar) las células hacia el centro del láser de una en una y de generar un flujo laminar; unos sistemas ópticos, constituidos tanto por las fuentes de luz como por los detectores de la luz dispersada y de la fluorescencia; y unos sistemas electrónicos e informáticos, encargados del procesado, transformación y análisis de las señales recibidas (Shapiro 2003a).

- Sistemas de fluidos: el sistema de fluidos de un citómetro de flujo transporta las células de la muestra hacia y a través de la región donde se lleva a cabo la excitación por el haz de luz y se toman las medidas. Para ello, en la cámara de flujo de un citómetro se produce un flujo laminar al interaccionar dos fluidos: el de la muestra y el de la vaina envolvente, que rodea el fluido que contiene la muestra (que es el núcleo). Ambos fluidos, el de la muestra y el de la vaina envolvente, nunca se mezclan, ya que se generan diferentes presiones y velocidades en diferentes puntos del sistema, y las células se localizan y circulan por el centro, alineándose hasta quedar en fila, de modo que pasan de una en una ante el haz de luz. El sistema de fluidos del citómetro de flujo se encuentra continuamente activo durante el paso de la muestra y debe mantener siempre ese flujo laminar a una velocidad constante para asegurar que las medidas se realicen de forma satisfactoria (Shapiro 2003a).

- Sistemas ópticos: Los sistemas ópticos de los citómetros de flujo incluyen tanto sistemas de iluminación como detectores que se encargan de recoger las señales de luz emitida. En general, los sistemas de iluminación en los citómetros actuales emplean luz láser, aunque también pueden emplear otras fuentes de iluminación, como las lámparas de arco. A su vez, entre los láseres, los más ampliamente empleados en citometría de flujo son los láseres de argón, que

generalmente emiten a 488 nm, una longitud de onda que es útil para excitar a muchos de los fluorocromos más utilizados, como FITC, PE, IP o cianinas, entre otros. La fuente luminosa consta de uno o dos láseres (con emisiones a diferentes longitudes de onda) y de una serie de lentes que dirigen el haz de luz hacia el punto deseado, que es la zona donde interacciona con las células y que debe ser siempre constante. Una vez producida esa interacción, la luz excita a los fluorocromos y es dispersada. A continuación debe producirse la recogida de estas señales lumínicas, lo que se lleva a cabo gracias a la existencia de detectores. Es muy frecuente que se empleen fotodiodos como detectores de la FSC y tubos fotomultiplicadores para detectar la SSC y la fluorescencia. Con el objetivo de seleccionar la longitud de onda específica que llega a cada fotodetector y dotar así de la especificidad de lectura de una u otra fluorescencia, se emplean filtros ópticos, que forman parte también del sistema óptico de los citómetros de flujo. Existen diferentes tipos de filtros, como los filtros de absorción, que absorben la luz a una determinada longitud de onda, o los filtros de interferencia o dicróicos, que reflejan la luz que tiene una longitud de onda superior o inferior a la que dejan pasar (Shapiro 2003a).

- **Sistema electrónico:** Una vez que se ha producido la interacción de la señal lumínica con los fotodetectores, se genera una señal eléctrica. El sistema electrónico del citómetro de flujo se encarga de procesar los pulsos detectados por los fotodetectores, es decir, se encarga de la detección y amplificación de la señal en forma analógica y la posterior transformación de esta señal analógica a digital. Tras el procesamiento informático de las señales pueden obtenerse en modo lista o como histogramas monoparamétricos, biparamétricos o multiparamétricos, junto con información de las diferentes poblaciones detectadas (Shapiro 2003a).

2.2.4. APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

En la actualidad la citometría de flujo es una técnica ampliamente empleada tanto en labores de investigación como en diferentes campos de la medicina y ha permitido avanzar enormemente en el conocimiento disponible sobre la etiología, patogenia, diagnóstico y pronóstico de multitud de enfermedades e, incluso, se ha empezado a emplear en ciertas terapias, principalmente de patologías oncológicas (Chabanne et al. 2000, Shapiro 2003d). Debido a la enorme cantidad de aplicaciones de la citometría de flujo, en esta revisión bibliográfica sólo se describirán brevemente algunas de las más relevantes.

Una de las aplicaciones más lógicas de esta técnica en labores clínicas es su empleo en hematología. En un principio se empleó en este sentido únicamente como un medio de recuento y diferenciación de las poblaciones celulares sanguíneas (Shapiro 2003d). Así, entre los usos de la citometría de flujo en hematología podemos destacar los recuentos de reticulocitos (y cálculo del índice de maduración de reticulocitos), recuento de plaquetas y cálculo de la fórmula leucocitaria, así como el estudio de las diferentes poblaciones celulares de la sangre (Shapiro 2003d). El desarrollo de los anticuerpos monoclonales y la definición de los grupos de diferenciación o CD permitieron lograr una caracterización más objetiva de las diferentes líneas hematopoyéticas y sus sucesivos estados de maduración (Chabanne et al. 2000), lo que se ha empleado en estudios de transfusiones, citopenias inmunomediadas o en la identificación y separación de las células madre pluripotenciales de la médula ósea, y han constituido la base para su aplicación en oncología, sobre todo en el fenotipaje de leucemias y linfomas, estableciendo diagnósticos y pronósticos y permitiendo alcanzar una mejor monitorización de la enfermedad (Shapiro 2003d).

De forma estrechamente relacionada, la inmunología ha sido uno de los campos que más se ha beneficiado del empleo rutinario de la citometría de flujo, permitiendo llevar a cabo la caracterización de una población celular heterogénea mediante la definición de subpoblaciones en base a la expresión de proteínas que en la membrana celular o, incluso, en el citoplasma, son identificables mediante anticuerpos monoclonales específicos, junto con la evaluación de parámetros intrínsecos a las células analizadas, como el tamaño y la complejidad, para lograr lo que se ha denominado inmunofenotipaje (Baumgarth & Roederer 2000, Owens et al. 2000, Shapiro 2003d). Así, se pueden evaluar las proporciones de células del sistema inmunitario y de subpoblaciones de células T o el estado de estimulación de los linfocitos y su síntesis de citocinas, lo que ha permitido evaluar el efecto de enfermedades infecciosas y no infecciosas, de base inmunomediada o no inmunomediada, sobre el sistema inmunitario. Uno de los usos más extendidos de la citometría de flujo y que, de hecho, se considera que ha sido fundamental para que esta técnica haya llegado a emplearse de forma tan extensa, es el estudio en medicina humana de la subpoblación de células TCD4+ en los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Shapiro 2003d).

Además, la citometría de flujo se emplea en estudios de ciclo celular, biología celular y molecular, en biotecnología y en ensayos de cinética celular en farmacología y permite identificar protozoos, bacterias y virus en el campo de la microbiología y parasitología (Fouchet et al. 1993, Yagi et al. 2000, O'Connor et al. 2001, Abbas et al. 2008k). También se ha empleado en estudios en el campo de la genética, que permiten identificar cromosomas y establecer diagnósticos prenatales o de portadores y que están

abriendo muchas puertas en el ámbito de las terapias génicas de diversas patologías (Shapiro 2003d).

En la clínica veterinaria el uso de la citometría de flujo aún hoy es mucho más limitado que en medicina humana, en parte debido a la menor cantidad de anticuerpos monoclonales disponibles para especies animales como el perro o el gato (Byrne et al. 2000). Sin embargo, cada vez se publican más trabajos llevados a cabo empleando citometría de flujo en estudios de inmunología, oncología, hematología, parasitología y microbiología veterinarias (Chabanne et al. 2000, Byrne et al. 2000, Strasser et al. 2000, Greeley et al. 2001, Faldyna et al. 2001, Blount et al. 2005, Comazzi et al. 2006, Horiuchi et al. 2007a, Horiuchi et al. 2007b, Lawler et al. 2008, Gelain et al. 2008, Stein et al. 2008, Williams et al. 2008, Hogenesch & Thompson 2009, Schultz et al. 2009, Day 2009).

2.3. EHRLICHIOSIS CANINA

2.3.1. INTRODUCCIÓN A LA EHRLICHIOSIS CANINA

Las ehrlichiosis son un grupo de enfermedades de transmisión vectorial causadas por bacterias gramnegativas que pueden afectar tanto a animales domésticos y salvajes como al hombre (Cohn 2003). Estos agentes se comportan como parásitos intracelulares obligados que se replican en el interior de fagosomas en el citoplasma de sus células diana, característica que las diferencia de otro grupo bacteriano estrechamente relacionado con ellas, las rickettsias, que se replican directamente en el citoplasma de las células (Cohn 2003, Hotopp et al. 2006). En general, las especies bacterianas implicadas en estas enfermedades se caracterizan por poseer tropismo por un tipo celular en concreto, diferenciándose especies monocitotrópicas (aquellas que predominantemente residen en monocitos y macrófagos), granulocitotrópicas (aquellas que infectan neutrófilos y eosinófilos) o trombocitotrópicas (aquellas que residen en las plaquetas del hospedador). Algunas de estas especies pueden infectar también células endoteliales y epiteliales (Rikihisa et al. 1985, Okada et al. 2003). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el tropismo descrito no es absoluto, pudiendo ser infectados varios tipos celulares por la misma especie bacteriana (Cohn 2003).

En 2001 Dumler y colaboradores llevaron a cabo una reorganización de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*, que previamente habían sido clasificados en base a sus características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas y clínicas. En la nueva clasificación taxonómica se emplearon análisis genéticos basados en la similitud del RNA ribosómico, del *groESL heat shock operon* y de genes que codifican proteínas de superficie, quedando finalmente la familia Anaplasmataceae dividida en tres genogrupos o géneros (*Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*) (Dumler et al. 2001), cuyos miembros producen, por lo general, una elevada reacción antigénica cruzada entre especies de un mismo genogrupo (Cohn 2003). Por lo tanto, taxonómicamente, estas especies quedarían clasificadas dentro del filum Proteobacterias, orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae (Dumler et al. 2001) y las diferentes especies quedarían incluidas en los géneros descritos de la siguiente forma:

- El género *Ehrlichia* incluye las especies *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium* y *E. muris*.
- El género *Anaplasma* incluye a *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. bovis* y *A. marginale*.
- El género *Neorickettsia* incluye a *N. risticii*, *N. sennetsu* y *N. helminthoeca*.

Como se ha mencionado previamente, estos agentes bacterianos requieren para su transmisión de la participación de vectores: garrapatas en el caso de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. (Groves et al. 1975, Cohn 2003, Neer & Harrus 2006) y trematodos en el caso de *Neorickettsia* spp. (Philip et al. 1954, Neer & Harrus 2006). Esta transmisión vectorial hace que la prevalencia de la infección por cada agente dependa de la distribución geográfica de su vector (Hinrichsen et al. 2001).

En la especie canina, la ehrlichiosis fue descrita por primera vez en Argelia en 1935 por Donatien y Lestoquard, quienes observaron unos pequeños microorganismos en el interior de los monocitos de perros infestados por garrapatas que habían desarrollado un cuadro patológico caracterizado por la aparición de fiebre y anemia (Donatien & Lestoquard 1935). En un principio el agente causal de esta enfermedad se denominó *Rickettsia canis*, aunque estudios posteriores llevaron a sustituir este nombre por el actual de *E. canis* (Moshkovskii 1945). Fue a partir de los años sesenta cuando se comenzó a dar una mayor importancia a la enfermedad, debido a la aparición de un proceso patológico agudo en perros militares británicos y americanos destacados en Singapur y Vietnam, respectivamente, que se caracterizaba por manifestaciones hemorrágicas graves, pancitopenia y emaciación y que causó la muerte de un elevado número de animales afectados (Huxsoll et al. 1970). En un principio la etiología de este proceso creó confusión, por lo que recibió diversos nombres, entre los que el más aceptado fue el de “pancitopenia tropical canina”, aunque finalmente se confirmó que el agente causal de aquella patología era *E. canis* (Huxsoll et al. 1969). A finales de los años 80 se produjo un nuevo repunte en la importancia que se daba a esta enfermedad debido a la descripción de la infección por *E. canis* en el hombre, aunque posteriormente se determinó que aquellos casos en medicina humana estaban causados por otra especie ehrlichial, *E. chaffeensis* (Maeda et al. 1987, Dawson et al. 1991, Neer & Harrus 2006).

2.3.2. ESPECIES DE LOS GÉNEROS *EHRlichia*, *ANAPLASMA* Y *NEORICKETTSIA* QUE AFECTAN A LA ESPECIE CANINA

Las especies de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia* que son capaces de infectar a la especie canina son:

- *E. canis*: como se ha comentado previamente, esta especie fue descrita en 1935 por Donatien y Lestoquard y, en la actualidad, continúa siendo uno de los principales agentes productores de enfermedad clínica y cuadros graves en el perro en todo el mundo. Se trata del agente etiológico primario de la ehrlichiosis monocítica canina (Woody & Hoskins 1991, Rikihisa 1991, Neer & Harrus 2006, Baneth et al. 2009) y, en nuestro país,

es el más importante agente causal de ehrlichiosis en el perro (Solano-Gallego et al. 2006, Amusatogui et al. 2008, Couto et al. 2010), por lo que en él nos centraremos posteriormente en esta revisión bibliográfica.

- *E. chaffeensis*: se trata del agente etiológico de la ehrlichiosis monocítica humana (Dawson et al. 1991, Anderson et al. 1991). Sin embargo, el papel potencial de *E. chaffeensis* como causante de enfermedad tras la infección natural en la especie canina no se ha confirmado hasta 1998, cuando se identificó esta especie en sangre de perros con sintomatología clínica y serorreactividad frente a antígenos de *E. canis* (Breitschwerdt et al. 1998b). Al igual que ocurre con *E. canis*, las células diana de *E. chaffeensis* son las células mononucleares (Neer & Harrus 2006). Su principal vector es la garrapata *Amblyomma americanum*, aunque también *Dermacentor variabilis* es capaz de transmitir la enfermedad (Neer & Harrus 2006). La distribución de este vector hace que se hayan descrito casos principalmente en Estados Unidos (Kordick et al. 1999, Neer & Harrus 2006).

- *A. platys*: la infección por *A. platys* en el perro da lugar a lo que tradicionalmente se ha denominado trombocitopenia cíclica infecciosa, descrita por primera vez en Estados Unidos en 1978 por Harvey y colaboradores (Harvey et al. 1978). Actualmente se trata de una enfermedad de distribución mundial (Harvey 2006). Esta especie constituye el único agente rickettsial con capacidad para infectar plaquetas en el perro (Harvey et al. 1978). La infección por *A. platys* se caracteriza por causar una trombocitopenia que suele ser cíclica y recurrente (Harvey et al. 1978) y, aunque se ha descrito que en muchas ocasiones los perros infectados son asintomáticos, la trombocitopenia puede acompañarse, entre otros signos, de la aparición de fiebre, anorexia, depresión, letargia, palidez de mucosas, pérdida de peso, secreción nasal y uveítis (Hibler et al. 1986, Woody & Hoskins 1991, Harrus et al. 1997a). Se cree que el vector de esta bacteria es, al igual que para *E. canis*, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, aunque los estudios experimentales llevados a cabo para tratar de confirmarlo no han obtenido resultados satisfactorios (Hibler et al. 1986, Simpson et al. 1991).

- *A. phagocytophilum*: bajo esta denominación se engloba a las especies anteriormente conocidas como *E. equi*, el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (HGE) y *E. phagocytophila* y, en el perro, es el agente causal de la anaplasmosis granulocítica canina (Dumler et al. 2001, Woldehiwet 2010), aunque es capaz de infectar a otras muchas especies animales, entre ellas caballos, gatos, rumiantes y al hombre (Dumler et al. 1995a, Dumler & Bakken 1995b, Woldehiwet 2010). Es una de las especies conocidas como granulocíticas, por su tropismo por neutrófilos y eosinófilos (Woldehiwet 2010). Los vectores de *A. phagocytophilum* parecen ser las garrapatas pertenecientes al

complejo de *Ixodes persulcatus*, siendo en Europa *I. ricinus* el principal vector de la enfermedad, si bien otras especies de garrapatas podrían estar implicadas en su transmisión (Woldehiwet 2010). En los perros con infección natural por *A. phagocytophilum* se ha descrito la aparición de signos clínicos inespecíficos, como fiebre, letargia y esplenomegalia y es frecuente hallar leucopenia debida a linfocitopenia y neutropenia así como trombocitopenia (Greig, Armstrong 2006a, Woldehiwet 2010).

- *E. ewingii*: se trata de otra de las especies denominadas granulocíticas, al igual que la anterior. Es el agente causal de la ehrlichiosis granulocítica canina (Goldman et al. 1998), aunque también puede infectar a otras especies animales y al hombre (Greig et al. 2006b). Su vector es la garrapata *A. americanum* (Wolf et al. 2000) y, hasta el momento, la infección por *E. ewingii* sólo ha sido descrita en Estados Unidos (Greig et al. 2006b). Los animales afectados presentan con frecuencia una poliartritis aguda, aunque, al igual que el resto de especies de la familia Anaplasmataceae que afectan al perro, es frecuente la aparición de una sintomatología inespecífica (Goldman et al. 1998, Greig et al. 2006b).

- *N. risticii*: la enfermedad causada por *N. risticii* fue descrita en primer lugar en caballos, especie en la que recibió el nombre de fiebre de los caballos de Potomac o ehrlichiosis monocítica equina. Se ha visto que puede causar una ehrlichiosis monocitotrópica en el perro tras la infección natural, descrita como una ehrlichiosis atípica (Kakoma et al. 1994). Sus células diana son los monocitos y macrófagos, pero también los enterocitos (Rikihisa et al. 1985). El modo de transmisión de *N.risticii* es desconocido, aunque se cree que podrían participar trematodos o nematodos (Neer & Harrus 2006).

- *N. helminthoeca*: es el agente casual de la enfermedad del salmón o “*salmon poisoning disease*” (SPD), patología descrita en 1950 en la especie canina que presenta una elevada mortalidad en los casos no tratados (Rikihisa 1991) y que se ha descrito principalmente en Estados Unidos (Gorham & Foreyt 2006). Esta especie infecta macrófagos e histiocitos intestinales (Rikihisa 1991) y es transmitida por el trematodo *N. salmincola* (Rikihisa 1991).

- *E. ruminantium*: se trata de una especie monocitotrópica que se ha visto que puede infectar de forma natural a la especie canina, habiendo sido detectada por métodos moleculares en sangre de perros tanto sanos como enfermos en algunos países africanos. Sin embargo, su potencial patógeno en esta especie, así como sus posibles vectores, son desconocidos por el momento (Neer & Harrus 2006).

2.3.3. EHRLICHIOSIS MONOCÍTICA CANINA

Generalmente se refiere a la enfermedad causada por *E. canis* como ehrlichiosis monocítica canina (EMC), debido a su tropismo por las células monocíticas, aunque a lo largo de la historia ha recibido numerosas denominaciones, como tifus canino, fiebre hemorrágica canina, síndrome hemorrágico idiopático, rickettsiosis canina, enfermedad del perro rastreador o pancitopenia tropical canina (Woody & Hoskins 1991).

E. canis puede infectar, además de al perro, a otras especies animales, especialmente miembros de la familia Canidae, como coyotes, lobos, zorros y chacales (Stiles 2000), aunque se ha sugerido que *E. canis* u otra especie estrechamente relacionada podría ser capaz de infectar al gato e, incluso, al hombre (Pérez et al. 1996, Breitschwerdt et al. 2002, Aguirre et al. 2004b, Pérez et al. 2006, Ayllón et al. 2009).

El vector de esta bacteria gramnegativa es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, probablemente la garrapata más ampliamente distribuida en el mundo (Groves et al. 1975), aunque experimentalmente también *Dermacentor variabilis* puede transmitir a *E. canis* (Johnson et al. 1998). *R. sanguineus* se infecta al ingerir sangre de un animal infectado, de forma más probable durante las primeras 2-3 semanas de la infección, ya que en este período existe un mayor número de leucocitos con *E. canis* en la sangre circulante (Woody & Hoskins 1991). Posteriormente, la garrapata transmitirá *E. canis* a otro hospedador al alimentarse de éste. El modo de transmisión es transestadial, pero no transovárico, y se ha observado que la garrapata puede transmitir la infección al perro susceptible hasta 155 días después de haber ingerido al agente (Lewis et al. 1977).

La infección natural en el perro se produce cuando la garrapata infectada se alimenta, ingiriendo la sangre y, a la vez, contaminando con sus secreciones salivares el punto donde se ha fijado. También se ha descrito la posibilidad de una transmisión yatrogénica mediante transfusiones sanguíneas procedentes de perros con EMC (Neer & Harrus 2006). Posteriormente, *E. canis* se replica en las células mononucleares de nódulos linfáticos, hígado, bazo y médula ósea (Reardon & Pierce 1981a), en los que penetra por endocitosis mediada por receptores proteicos de la superficie celular (Messick & Rikihisa 1993). En el interior de su célula diana, estos microorganismos inicialmente se desarrollan en forma de lo que se denominan “cuerpos elementales”, con un diámetro de 0,5-0,9 µm (Nyindo et al. 1971). Dichos cuerpos elementales aumentan de tamaño, se replican por fisión binaria y se agrupan, pasando a ser los denominados “cuerpos iniciales”, de 1,4-2 µm de diámetro, que continúan replicándose y agrupándose y, por tanto, aumentando de tamaño, para dar lugar a las “mórulas”, colonias bacterianas rodeadas por una membrana vacuolar, que poseen un diámetro mayor a 2 µm y que son denominadas así por su forma

típica (Nyindo et al. 1971). Los microorganismos se liberan de la célula hospedadora por lisis celular y exocitosis (Rikihisa 1991).

2.3.3.1. Patogenia y cuadro clínico de la EMC

El período de incubación de la EMC puede variar en la infección natural entre 8 y 20 días (Hibler et al. 1986) tras el que se describen clásicamente tres fases de la enfermedad: aguda, subclínica y crónica. Estas fases han sido descritas en las infecciones experimentales y, sin embargo, en la infección natural no son fácilmente distinguibles entre sí (Woody & Hoskins 1991).

Tras la entrada y replicación en el interior de las células monocíticas de *E. canis* se produce la fase aguda de la enfermedad, que consiste en la multiplicación y diseminación por la circulación sanguínea o linfática de las bacterias y que habitualmente dura entre dos y cuatro semanas (Huxsoll et al. 1970, Hibler et al. 1986). Esta diseminación de *E. canis* por el organismo le permite distribirse por aquellos órganos que presentan una población numerosa de fagocitos mononucleares, como son el hígado, bazo y nódulos linfáticos, lo que da como resultado el desarrollo de una hiperplasia linforreticular y el consiguiente aumento de tamaño de estos órganos (Reardon & Pierce 1981a). Pero además de afectar a hígado, bazo y nódulos linfáticos, *E. canis* se disemina por otros órganos, produciendo vasculitis e inflamación perivascular en pulmón, riñón y meninges y es posible que se desarrolle una coagulación intravascular diseminada (Reardon & Pierce 1981a, Hibler et al. 1986).

Los signos clínicos observados durante esta fase son inespecíficos (Harrus et al. 1999), destacando la aparición de fiebre, apatía, anorexia, pérdida de peso, secreción oculo-nasal, palidez de mucosas y, en ocasiones, linfadenomegalia, esplenomegalia y edema en extremidades o escroto (Huxsoll et al. 1970, Woody & Hoskins 1991, Sainz 1996a, Neer & Harrus 2006). Además pueden presentarse signos hemorrágicos, aunque éstos son más frecuentes en la fase crónica de la enfermedad (Neer & Harrus 2006). En ocasiones pueden presentarse durante esta fase signos oculares, como conjuntivitis, opacidad corneal, uveítis anterior, panuveítis, hipema, hemorragias retinianas, desprendimiento de retina o glaucoma (Harrus et al. 1998a). También pueden aparecer signos respiratorios, entre los que destacan disnea, exudado oculonasal y aumento de la intensidad de los sonidos respiratorios, que pueden deberse al desarrollo de una neumonía intersticial (Codner et al. 1985).

En la mayoría de los animales, la fase aguda se resuelve espontáneamente, progresando la enfermedad a la fase subclínica (Codner & Farris-Smith 1986) e, incluso, se ha descrito que algunos perros son capaces de eliminar *E. canis* gracias al desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada (Eddlestone et al. 2007).

Durante la fase subclínica el perro únicamente muestra alteraciones biopatológicas, entre las que destacan, como veremos más adelante, la trombocitopenia e hiperglobulinemia. Clínicamente el animal parece sano, desapareciendo la fiebre y demás sintomatología observada en la fase anterior y recuperando el peso perdido (Woody & Hoskins 1991). La duración de esta fase puede ser muy variable; así, se ha descrito en infecciones experimentales una duración de entre 40 y 120 días para esta fase (Woody & Hoskins 1991), mientras que en la infección natural puede durar hasta 5 años (Codner & Farris-Smith 1986). Parece que durante esta fase, el bazo es el responsable de albergar a *E. canis* (Neer & Harrus 2006). No se conocen con exactitud los factores que pueden influir en la progresión de la enfermedad hacia la fase crónica y parece que aquellos animales que son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada pueden eliminar el agente (Woody & Hoskins 1991, Neer & Harrus 2006).

Es muy frecuente que la EMC se diagnostique durante la fase crónica de la enfermedad (Cohn 2003). Algunos autores consideran que es más apropiado diferenciar una fase crónica leve y una fase crónica grave (Woody & Hoskins 1991). La gravedad de esta fase dependerá de varios factores, como la virulencia de la cepa de *E. canis*, el estado inmunitario del perro, su edad, su raza, la existencia de enfermedades concurrentes o el estrés (Nyindo et al. 1980, Woody & Hoskins 1991). Como se verá más adelante, se ha sugerido que el Pastor Alemán está más predispuesto a padecer una forma de ehrlichiosis más grave que otras razas, como el Beagle (Nyindo et al. 1980).

De nuevo en esta fase podemos encontrar signos clínicos inespecíficos, similares a los descritos durante la fase aguda, entre los que destacan la aparición de letargia, anorexia y pérdida de peso. En la exploración física con frecuencia encontraremos linfadenomegalia, fiebre, palidez de mucosas y esplenomegalia (Harrus et al. 1997b, Mylonakis et al. 2004). Asimismo, es frecuente el hallazgo de signos hemorrágicos, como epistaxis, melena, petequias y/o equimosis, hipema, hemorragias retinianas y hematuria (Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Mylonakis et al. 2004). En ocasiones pueden observarse alteraciones oftalmológicas, principalmente uveítis anterior y diferentes cambios retinianos, que pueden conducir, incluso, a la ceguera del animal (Frank & Breitschwerdt 1999, Neer & Harrus 2006). Probablemente debido a hemorragias, vasculitis o infiltración plasmocitaria perivascular en las meninges (Hibler et al. 1986) pueden aparecer signos neurológicos, como ataxia, paraparesia, déficit en la propiocepción o

nistagmo (Woody & Hoskins 1991, Frank & Breitschwerdt 1999). Algunos perros con EMC pueden presentar signos locomotores debidos a polimiositis o poliartritis, cuya causa puede ser el desarrollo de hemartrosis o el depósito de inmunocomplejos. Sin embargo, la aparición de esta sintomatología se asocia en la mayoría de los casos con especies granulocitotrópicas, como *E. ewingii* o *A. phagocytophilum* (Cowell et al. 1988, Neer & Harrus 2006). Además, se ha descrito la posibilidad de aparición de síntomas respiratorios, con exudado nasal, disnea y tos, como consecuencia de una neumonía intersticial (Reardon & Pierce 1981a), y síntomas reproductivos, con esterilidad, muerte neonatal y abortos (Woody & Hoskins 1991). En la fase crónica grave de la EMC pueden aparecer signos clínicos asociados con el desarrollo de glomerulonefritis y/o hipoplasia o aplasia de médula ósea, que se asocian con un mal pronóstico de la enfermedad (Frank & Breitschwerdt 1999, Cohn 2003).

En las infecciones naturales por *E. canis* el hecho de que la sintomatología pueda ser similar en la fase aguda y en la fase crónica hace que no siempre sea posible diferenciarlas clínicamente.

2.3.3.2. Hallazgos laboratoriales en la EMC

Como se ha comentado, la infección por *E. canis* en el perro puede cursar con una sintomatología muy poco específica o, incluso, hacer que los animales permanezcan asintomáticos durante largos períodos de tiempo, por lo que no es infrecuente que sean los hallazgos de la analítica sanguínea los que nos hagan sospechar de esta enfermedad.

Entre los cambios en la hematología que con mayor frecuencia se describen en la EMC destaca la trombocitopenia, que puede aparecer tan pronto como a los 15-20 días tras la infección y que puede mantenerse durante todas las fases de la enfermedad (Huxsoll et al. 1970, Woody & Hoskins 1991, Harrus et al. 1997b, Mylonakis et al. 2004, Frank & Breitschwerdt 1999, Neer & Harrus 2006). Sin embargo, es importante destacar que es posible encontrar animales con recuentos plaquetarios normales, por lo que no debe descartarse la ehrlichiosis por la ausencia de trombocitopenia (Neer & Harrus 2006). Además de un descenso en el número de plaquetas, pueden aparecer desórdenes de la funcionalidad plaquetaria, principalmente debidas a alteraciones de la agregación y migración en sangre (Kakoma et al. 1978). Más adelante, en esta revisión bibliográfica, se describirán con más detalle los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en estas alteraciones plaquetarias.

También es frecuente observar en el curso de la EMC la existencia de anemia (Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999), que puede ser más o menos intensa y que en la fase aguda de la enfermedad suele ser regenerativa debido al aumento de la destrucción de hematíes por mecanismos inmunológicos (Reardon & Pierce 1981a). En la fase crónica de la EMC la anemia observada es no regenerativa, debido a la destrucción continuada de eritrocitos, a la pérdida crónica de sangre y a la existencia de una hipoplasia o aplasia de médula ósea (Woody & Hoskins 1991).

La infección por *E. canis* puede producir tanto leucopenia como leucocitosis, aunque esta última es menos frecuente. Se ha sugerido que en las fases iniciales el secuestro leucocitario por procesos inmunológicos puede dar lugar a la aparición de leucopenia (Reardon & Pierce 1981a), mientras que en la fase crónica podría deberse a la aplasia medular mencionada (Neer & Harrus 2006). Dentro de la serie blanca pueden encontrarse diferentes alteraciones, como neutropenia, linfocitosis o linfopenia y monocitosis, aunque estos hallazgos pueden ser muy variables (Mylonakis et al. 2004).

La hiperproteinemia por hiperglobulinemia parece ser el hallazgo más frecuente en la bioquímica sanguínea en los perros con EMC (Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Neer et al. 2002, Mylonakis et al. 2004, Harrus & Waner 2010). Esta hiperglobulinemia suele deberse a una gammapatía policlonal, pero también se ha descrito la presentación de gammapatías monoclonales (Breitschwerdt et al. 1987, Neer et al. 2002). A menudo se asocia esta hiperglobulinemia con la presencia de hipoalbuminemia, que puede deberse, entre otros, a la existencia de proteinuria, pérdida de peso, malnutrición, hepatopatía o a un intento de compensación de la hiperproteinemia (Hibler et al. 1986, Woody & Hoskins 1991). También se han descrito en la bioquímica sanguínea elevaciones de algunas enzimas hepáticas (Harrus et al. 1997b, Mylonakis et al. 2004), así como de la creatinina. Este aumento de la creatinina podría tener un origen prerrenal (por deshidratación) o renal (por glomerulonefritis o plasmocitosis intersticial renal) (Breitschwerdt et al. 1987).

2.3.3.3. Diagnóstico de la EMC

Los signos clínicos y las alteraciones analíticas observadas pueden sugerir la existencia de una EMC, pero, debido a la inespecificidad mencionada, no son concluyentes, por lo que es necesario recurrir a pruebas analíticas específicas que determinen de forma directa o indirecta la infección por *E. canis*.

Los métodos directos de diagnóstico de EMC se basan en la detección u observación del agente etiológico a partir de muestras obtenidas del animal sospechoso. La observación de mórulas de *Ehrlichia* spp. en el interior de los leucocitos a partir de frotis sanguíneos o aspirados de tejidos (como bazo, médula ósea, pulmón, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o nódulo linfático) permite un diagnóstico definitivo de la enfermedad (Neer & Harrus 2006). Sin embargo, y a pesar del desarrollo de técnicas destinadas a incrementar la posibilidad de identificar mórulas a partir de estas muestras (Huxsoll et al. 1970, Mylonakis et al. 2003), esta técnica resulta muy poco sensible, ya que las mórulas aparecen con mayor frecuencia en la fase aguda de la enfermedad y de forma transitoria, gracias a la presencia de un mayor número de leucocitos infectados en la sangre en esta fase (Hibler et al. 1986, Woody & Hoskins 1991). Se ha estimado que sólo se observan mórulas en un 4% de los frotis (Woody & Hoskins 1991). A esto hay que añadir el hecho de que es necesario personal entrenado y cualificado para la detección de las mórulas sin confundirlas con artefactos, tinciones mal realizadas u otras inclusiones (Mylonakis et al. 2003).

Otro posible método de diagnóstico directo de la infección por *E. canis* sería el cultivo de este agente a partir de muestras del animal sospechoso en líneas celulares susceptibles de ser infectadas por este agente, como la línea celular macrofágica canina DH82. Sin embargo, este método es laborioso y requiere mucho tiempo, por lo que queda prácticamente relegado a labores de investigación (Harrus & Waner 2010).

Las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR y la posterior secuenciación del material amplificado, son métodos sensibles y específicos para la detección y caracterización de estas infecciones (Harrus & Waner 2010). Se ha descrito la detección de DNA de *E. canis* a los 4-10 días post-infección (Iqbal & Rikihisa 1994b), en ocasiones antes de que se puedan detectar anticuerpos en sangre. Esta técnica puede ayudar, además, a confirmar la eliminación del microorganismo tras el tratamiento, ya que detecta el ADN del mismo y, por tanto, la existencia de infección activa. Esto permite diferenciar entre aquellos perros que han sido tratados pero permanecen infectados de aquellos que tras el tratamiento han eliminado a *E. canis* pero mantienen títulos de anticuerpos elevados (Harrus et al. 1998b).

Sin embargo, esta técnica posee algunos inconvenientes que deben ser tenidos en cuenta a la hora de su empleo como método de diagnóstico, entre los que se encuentran su elevado coste, la falta de estandarización entre laboratorios o la aparición de resultados falsos positivos o falsos negativos. Esto hace que sea recomendable emplear la PCR siempre en combinación con la serología para el diagnóstico de la EMC (Neer et al. 2002).

Una alternativa a los métodos diagnósticos que permiten una detección directa de *E. canis* son los métodos indirectos, que permiten determinar la presencia del agente infeccioso mediante la valoración de la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador. En general, con estos métodos indirectos se valora la respuesta inmunitaria de tipo humoral que se desencadena. De hecho, la detección de los anticuerpos generados mediante técnicas serológicas es una de los métodos más comúnmente empleados para el diagnóstico de la EMC (Harrus & Waner 2010), pudiendo emplearse tanto la inmunofluorescencia indirecta (IFI) como el *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) o el inmunoblot (Ristic et al. 1972, Waner et al. 2000b, Waner et al. 2001, Harrus & Waner 2010).

La IFI para la detección de anticuerpos IgG anti-*E. canis* fue desarrollada en 1972 por Ristic y colaboradores, presenta una alta sensibilidad y especificidad y es considerada la técnica serológica “*gold-standard*” o de referencia para el diagnóstico de la EMC (Ristic et al. 1972, Waner et al. 2001, Neer et al. 2002, Harrus & Waner 2010). Las IgM no se consideran un indicador fiable de la exposición a *E. canis*, debido a la elevada variabilidad de los anticuerpos IgM en esta infección (McBride et al. 2003). Para realizarla, por lo general se emplean como antígeno cultivos celulares infectados por *E. canis*, que se fijan a un porta especial para inmunofluorescencia al que se enfrentarán diluciones seriadas de la muestra sérica del perro sospechoso (Ristic et al. 1972).

Al emplear esta técnica como método diagnóstico se debe tener en cuenta que un resultado serológico positivo en una muestra de un perro que vive en una zona endémica de EMC sólo confirma la exposición al patógeno, pero no confirma que los síntomas observados en el animal sean necesariamente causados por *E. canis*, ya que los anticuerpos pueden mantenerse elevados incluso después de haber eliminado la infección o durante la fase subclínica (Neer & Harrus 2006). No obstante, un título de anticuerpos positivo junto con signos clínicos y/o alteraciones laboratoriales compatibles con EMC es considerado diagnóstico (Neer et al. 2002). De la misma forma, un resultado negativo no siempre permite descartar la infección por *E. canis*, ya que aquellos animales que se encuentran en una fase muy avanzada y grave de la enfermedad o los animales moribundos pueden ser incapaces de desarrollar anticuerpos (Waner et al. 2001). Además, esta técnica permite detectar anticuerpos de forma tan temprana como a los 3 días postinfección, pero muchos perros no serán seropositivos hasta 28 días después de infectarse (Iqbal et al. 1994a, Neer & Harrus 2006). Por lo tanto, en los casos clínicamente sospechosos de EMC que dan un resultado serológico negativo se recomienda repetir la prueba a las 2-3 semanas en busca de seroconversión (Neer et al. 2002, Neer & Harrus 2006, Harrus, Waner 2010).

El diagnóstico serológico de la EMC se complica por la existencia de reacciones cruzadas entre *E. canis* y otras especies de la familia Anaplasmataceae (Neer & Harrus 2006, Harrus, Waner 2010). *E. canis* no presenta reacción cruzada con *A. platys*, pero sí con *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. ewingii*, *N. helminthoeca*, *N. risticii* y, en menor medida que con las anteriores, con *A. phagocytophilum* (Waner et al. 2001, Neer et al. 2002, Neer & Harrus 2006, Harrus & Waner 2010). Ante un resultado serológico positivo se debería valorar la posible exposición a estas especies bacterianas teniendo en cuenta el área geográfica de residencia del perro y su historial de viajes, ya que de las especies mencionadas, solamente se ha descrito la presencia de *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *A. platys* en nuestro país (Sainz et al. 1999, Sainz et al. 2000a, Neer et al. 2002, Neer & Harrus 2006, Amusatogui et al. 2008, Harrus & Waner 2010). En cualquier caso, desde un punto de vista clínico, estos agentes se comportan de modo parecido y su abordaje clínico y terapéutico es similar.

Además de la IFI, se han desarrollado técnicas ELISA para el diagnóstico de la EMC que han permitido poner al alcance de los clínicos veterinarios métodos diagnósticos que pueden realizarse sin necesidad de equipo especial ni personal cualificado (Waner et al. 2000b, Harrus & Waner 2010). El ELISA aplicado al diagnóstico de la infección por *E. canis* sirve para la detección de anticuerpos IgG frente a este agente (Waner et al. 2000b). Algunos autores consideran que existe una baja correlación entre los resultados obtenidos entre los ELISAs comercialmente disponibles, el Western blot y la IFI a títulos de anticuerpos bajos, lo que debe ser tenido en cuenta a la hora de su utilización (O'Connor et al. 2006).

El inmunoblot o Western immunoblot es una técnica serológica más específica que puede servir de ayuda a la hora de caracterizar el agente implicado en la infección, sobre todo si existen dudas derivadas de las posibles reacciones cruzadas ya descritas (Rikihisa et al. 1994, Harrus & Waner 2010).

2.3.3.4. Tratamiento de la EMC

Incluye, por una parte, un tratamiento farmacológico específico que permita eliminar al agente causal de la enfermedad y, por otra parte, una terapia de apoyo sintomático que favorezca la recuperación del animal afectado (Neer & Harrus 2006). Entre los fármacos eficaces frente a estos agentes destacan las tetraciclinas, el dipropionato de imidocarb, la amicarbalida y el cloranfenicol (Neer & Harrus 2006). Se recomienda comenzar el tratamiento lo más pronto posible, ya que muchas de las complicaciones o

alteraciones que se producen en el curso de la fase crónica de la EMC hacen que sea más complicada la recuperación del animal (Woody & Hoskins 1991, Mylonakis et al. 2004).

Dentro del grupo de las tetraciclinas, la tetraciclina y la oxitetraciclina fueron empleadas para el tratamiento de las ehrlichiosis y aún se describe una buena actividad antirickettsial para estas sustancias. Sin embargo, las tetraciclinas semisintéticas doxiciclina y minociclina son en la actualidad las drogas de elección en el tratamiento de la EMC (Breitschwerdt et al. 1998a, Sainz et al. 2000b, Neer et al. 2002, Neer & Harrus 2006) debido a su mayor liposolubilidad, excelente absorción y una menor nefrotoxicidad. El hecho de que posean una mayor liposolubilidad hace que su penetración en las células sea mayor, lo que favorece que estas sustancias sean más eficaces en la lucha frente a *E. canis*, bacteria intracelular obligada. La administración de estas sustancias se realiza por vía oral, aunque la doxiciclina puede ser administrada también por vía intravenosa. Más adelante, en esta revisión bibliográfica, se abordarán de forma más extensa las características y propiedades de este grupo de fármacos y, más concretamente, de la doxiciclina.

La duración del tratamiento parece ser más importante que la dosis o la frecuencia de administración de las tetraciclinas (Woody & Hoskins 1991). Sin embargo, por el momento no se ha fijado una duración del tratamiento que garantice la eliminación completa del agente, aunque se ha recomendado la administración de doxiciclina a dosis de 10 mg/kg cada 24 horas durante 28 días (Neer et al. 2002). Tratamientos de menor duración han resultado en algunas ocasiones insuficientes en la eliminación de *E. canis* (Iqbal & Rikihisa 1994b, Schaefer et al. 2007), mientras que el empleo de la doxiciclina durante los 28 días recomendados ha mostrado ser eficaz en la eliminación de este agente en diferentes estudios (Breitschwerdt et al. 1998b, Eddlestone et al. 2007). No obstante, Harrus y colaboradores en 1998 describieron la persistencia de *E. canis* tras un tratamiento con doxiciclina de 6 semanas de duración en un perro que se encontraba en la fase subclínica de la EMC (Harrus et al. 1998b). Generalmente, tras 24-48 horas del comienzo de la administración de doxiciclina se observa una marcada mejoría clínica en los perros que se encontraban en la fase aguda o en la fase crónica leve de la enfermedad (Neer & Harrus 2006).

Los principales efectos adversos de la administración de tetraciclinas son alteraciones gastrointestinales, pudiendo causar vómitos tras su administración por vía oral. Asimismo estas sustancias pueden causar decoloración de los dientes en desarrollo y puede afectar a la funcionalidad renal y/o hepática. Sin embargo, la doxiciclina es el miembro más seguro de las tetraciclinas, ya que se excreta en forma de conjugado inactivo con las heces, con lo que disminuye sus efectos negativos sobre el tracto intestinal y puede ser

administrada en animales con insuficiencia renal. Además, si se administra con alimento pueden evitarse en la mayoría de los casos las náuseas y los vómitos (Riviere & Spoo 2001).

El dipropionato de imidocarb puede ser una alternativa terapéutica eficaz en el tratamiento de la EMC. Su administración se lleva a cabo por vía intramuscular o subcutánea, a dosis de 5-7 mg/kg en dos inyecciones separadas por 15 días (Matthewman et al. 1994, Sainz et al. 2000b). Se trata de un fármaco de carácter ácido, por lo que puede producir dolor en el punto de inoculación y, en ocasiones, provoca efectos anticolinesterasa como salivación, disnea, taquicardia, temblores o diarrea (Woody & Hoskins 1991), que pueden revertirse mediante el empleo de atropina o glicopirrolato (Cohn 2003). Un estudio publicado en 1980 muestra un mayor efecto terapéutico del dipropionato de imidocarb en comparación con la tetraciclina administrada durante dos semanas (Price & Dolan 1980), pero estudios posteriores empleando doxiciclina y dipropionato de imidocarb de forma conjunta han mostrado que no existen diferencias significativas en las respuestas clínicas entre los perros tratados con ambas drogas o con una sola de ellas por separado, retrasándose, sin embargo, la recuperación a los valores normales de los recuentos plaquetarios y proteinogramas en los perros a los que se les administró dipropionato de imidocarb (Sainz et al. 2000b). En la misma línea, recientemente se ha constatado que el dipropionato de imidocarb no es capaz de eliminar *E. canis* en perros experimentalmente infectados por este agente (Eddlestone et al. 2006).

La amicarbalida es una diamidina aromática empleada en el tratamiento de las babesiosis que ha sido utilizada también en el tratamiento de las ehrlichiosis, aunque los estudios llevados a cabo sobre su eficacia en estas enfermedades son escasos. Se emplea a dosis de 5-6 mg/kg, por vía intramuscular en dos inyecciones separadas por un intervalo de 15 días (Neer & Harrus 2006).

El cloranfenicol es otro de los fármacos que pueden ser empleados en el tratamiento de la EMC y ha sido recomendado para el tratamiento de cachorros menores de 5 meses para evitar la decoloración de los dientes en erupción que causan los fármacos de la familia de las tetraciclinas (Neer & Harrus 2006). Sin embargo, debido a los riesgos sobre la salud pública derivados del uso del cloranfenicol y a que posee un efecto depresor de la médula ósea, a lo que se une el hecho de que existen mejores alternativas (principalmente, doxiciclina y dipropionato de imidocarb), este fármaco no suele emplearse en la práctica clínica para el tratamiento de la EMC (Neer & Harrus 2006).

Otra alternativa descrita para el tratamiento de la EMC la constituyen las quinolonas, que poseen cierta actividad antirickettsial. Entre ellas, la enrofloxacin se ha

visto que es eficaz en el tratamiento de la infección por *R. rickettsii* en perros, por lo que algunos autores sugieren que podría ser eficaz en el tratamiento de la infección causada por *E. canis* (Greene & Breitschwerdt 2006). Sin embargo, en la infección experimental parece que no es capaz de eliminar a este agente (Neer et al. 1999).

Aunque no existen estudios sobre su eficacia, se han descrito otras posibilidades en el tratamiento de la EMC, como son: eritromicina, macrólidos, rifampicina, penicilina y aminoglicósidos, entre otros (Neer & Harrus 2006).

Como terapia de apoyo, en ocasiones puede ser necesario emplear fluidoterapia o, incluso, llevar a cabo transfusiones de sangre completa (en casos de anemia o pancitopenia) o de plasma rico en plaquetas (en casos de trombocitopenia marcada) (Huxsoll et al. 1970, Neer & Harrus 2006). También se ha descrito el empleo de glucocorticoides durante 2-7 días para atenuar los efectos inmunomediados relacionados con la infección, como son la trombocitopenia, la poliartritis, la vasculitis y meningitis (Frank & Breitschwerdt 1999, Neer, Harrus 2006).

Tras el tratamiento de los perros diagnosticados de EMC que se encuentran en la fase aguda, subclínica o crónica leve, la **respuesta clínica** suele ser muy buena y se evidencia a las 24-48 horas, mejorando el apetito, actividad del animal y demás sintomatología (Frank & Breitschwerdt 1999, Sainz et al. 2000b, Neer & Harrus 2006), aunque en ocasiones la respuesta puede ser más lenta (Frank & Breitschwerdt 1999). La normalización de las alteraciones de la analítica sanguínea suele ser más progresiva. La resolución de la trombocitopenia se suele producir en un período de 7 a 10 días tras el inicio del tratamiento y es recomendable monitorizar el valor plaquetario para evaluar la eficacia de la terapia instaurada (Neer & Harrus 2006). En cuanto a las alteraciones del proteinograma, los valores de la albúmina y de las globulinas se suelen normalizar en 3-9 meses, aunque pueden tardar hasta 12 meses en hacerlo (Neer & Harrus 2006). El título de anticuerpos específicos frente a *Ehrlichia* spp. disminuye progresivamente tras el tratamiento eficaz y generalmente se negativiza a los 6-9 meses (Neer et al. 2002), aunque algunos animales, a pesar de mejorar clínicamente, mantienen títulos elevados durante años, lo que puede indicar la permanencia del agente en el organismo, una producción de anticuerpos persistente, una nueva infección por *E. canis* o, simplemente, una respuesta inmunitaria residual indicativa de una infección pasada (Woody & Hoskins 1991, Frank & Breitschwerdt 1999, Neer et al. 2002). Además, se ha observado que cuando el título de anticuerpos de partida al comenzar el tratamiento es muy elevado, el tiempo necesario para su normalización o negativización es mayor que cuando se parte de un título bajo (Greene 1995, Sainz et al. 2000b). En ocasiones, el hecho de que los anticuerpos frente a *E. canis* permanezcan durante períodos de tiempo tan prolongados hace que sea difícil establecer si

el agente ha sido realmente eliminado del hospedador, por lo que puede ser aconsejable la realización de la PCR en combinación con la serología para garantizar que el tratamiento ha sido eficaz (Neer et al. 2002). Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta técnica no va a distinguir entre los microorganismos vivos y los muertos y que si *E. canis* permanece secuestrado en algún órgano, como el bazo, el resultado de la PCR a partir de una muestra de sangre periférica será negativo, a pesar de la persistencia del agente (Neer et al. 2002).

Por otra parte, si un animal no muestra mejoría clínica y/o resolución de las alteraciones analíticas tras 1-2 semanas del comienzo del tratamiento, debe considerarse la posibilidad de que existan otras patologías concurrentes o que la causa de la sintomatología no sea la infección por *E. canis* (Cohn 2003, Neer, Harrus 2006).

En general se considera que el pronóstico de la EMC tras el tratamiento será favorable en las fases aguda, subclínica o crónica leve (Woody & Hoskins 1991), mientras que en la fase crónica grave, que puede asociarse con el desarrollo de insuficiencia renal o aplasia de médula ósea, entre otros desórdenes, será desfavorable (Woody & Hoskins 1991, Frank, Breitschwerdt 1999, Mylonakis et al. 2004).

2.3.3.5. Prevención de la EMC

Desafortunadamente no existe por el momento una vacuna que permita proteger a los perros frente a la infección por *E. canis* (Neer & Harrus 2006). Por lo tanto, la prevención de esta enfermedad se centra en el control de los vectores. A ello debe unirse el diagnóstico precoz de los animales enfermos y la aplicación de un tratamiento farmacológico adecuado (Neer & Harrus 2006).

Se ha descrito la posibilidad de administrar doxiciclina de modo preventivo a perros que puedan estar expuestos a la EMC (Davoust et al. 2005), pero este empleo de las tetraciclinas puede llevar al desarrollo de resistencias microbianas (Neer & Harrus 2006).

En las áreas endémicas debe mantenerse un control estricto de las garrapatas, principalmente mediante el empleo de antiparasitarios externos, entre los que destacan por su eficacia, entre otros, los collares de amitraz, el fipronil y la asociación de imidacloprid con permetrina (10% y 50%, respectivamente) (Davoust et al. 2003, Estrada-Peña & Reme 2005, Otranto et al. 2008, Otranto et al. 2010). Podrían emplearse, asimismo, antiparasitarios ambientales (Woody & Hoskins 1991).

Por otra parte, debe evitarse el acceso de los perros a las zonas infestadas por garrapatas e inspeccionar al animal para detectarlas y eliminarlas, sobre todo después de sus paseos, disminuyendo así la probabilidad de transmisión de *E. canis* y otros agentes (Neer et al. 2002).

Todos los animales que sean introducidos en una colectividad deberían ser analizados serológicamente para la detección de estas infecciones, protegidos frente a las garrapatas y aislados hasta que se tenga los resultados de las analíticas, para evitar de este modo introducir portadores en la colectividad (Woody & Hoskins 1991).

Debido a la posibilidad de transmisión yatrogénica de la EMC mediante transfusiones sanguíneas, sería recomendable descartar la infección de los perros donantes (Woody & Hoskins 1991).

2.3.3.6. La EMC en España

La primera descripción de EMC en nuestro país data de 1988 (Font et al. 1988). Desde entonces se han descrito casos en casi todas las comunidades autónomas, con valores de seroprevalencia que varían entre un 1,98% y un 66,7% en función de diferentes variables, como las regiones estudiadas y las medidas preventivas adoptadas frente a las garrapatas (Sainz et al. 1995, Sainz et al. 1996b, Sainz et al. 1998, Solano-Gallego et al. 2006, Amusatogui et al. 2008, Couto et al. 2010), habiéndose señalado una prevalencia en Madrid de un 6,5% (Sainz et al. 1998).

En el año 2004 Aguirre y colaboradores describieron el primer aislamiento y cultivo de *E. canis* en España a partir de la sangre de un perro con infección natural, con lo que se identificó genéticamente por primera vez este agente en nuestro país (Aguirre et al. 2004a).

La infección por *E. canis* parece encontrarse extendida por la práctica totalidad del territorio nacional, probablemente debido a que su vector, la garrapata *R. sanguineus*, es la más ubicua y frecuente en perros de nuestro país (Estrada-Peña 1995).

Se ha sugerido que un mayor contacto con las garrapatas en las áreas rurales puede ser la causa de una mayor prevalencia de la presentación de esta infección en los perros de estas zonas (Sainz et al. 1995). De forma estrechamente relacionada, se ha visto que los perros de caza con infestación masiva de garrapatas tienen una mayor prevalencia de infección que perros con un control profiláctico exhaustivo frente a las mismas (Sainz et al.

1995) y que los animales procedentes de perreras se encuentran más expuestos a la ehrlichiosis que los atendidos en clínicas particulares (Amusatogui et al. 2008).

2.3.3.7. Inmunopatogenia y respuesta inmunitaria en la EMC

Como se ha descrito previamente, la EMC es una enfermedad causada por *E. canis*, bacteria gramnegativa intracelular obligada que es capaz de inducir en el perro una enfermedad potencialmente mortal (Harrus et al. 1999).

A pesar de que la primera descripción de ehrlichiosis canina se remonta a 1935 (Donatien & Lestoquard 1935), hoy en día todavía no han sido bien definidos ni los mecanismos inmunitarios protectores desarrollados por el hospedador ni la patogenia de la enfermedad en la infección por *E. canis* (Mavromatis et al. 2006, Unver et al. 2006). Sin embargo, los ensayos *in vitro* y el desarrollo de modelos murinos *in vivo* empleando otras especies de *Ehrlichia* altamente relacionadas, así como los estudios llevados a cabo en infecciones naturales por *Ehrlichia* spp. en el hombre y otros animales, han permitido progresar significativamente en la comprensión actual de los mecanismos de la inmunidad e inmunopatogenia de la ehrlichiosis (Feng & Walker 2004, Walker et al. 2004, Chapes & Ganta 2008).

A continuación se revisarán los conocimientos actuales referentes a los aspectos más significativos de la evasión y respuesta inmunitaria en las infecciones ehrlichiales, así como de la inmunopatogenia de estas enfermedades.

Evasión inmunitaria

La capacidad de supervivencia y patogenicidad de cualquier microorganismo en el hospedador va a depender de forma directa de su habilidad para evitar o resistir los mecanismos efectores de la inmunidad (Abbas et al. 2008f). Las bacterias intracelulares obligadas, entre ellas las pertenecientes al género *Ehrlichia*, han desarrollado diferentes estrategias que les permiten asegurar no sólo su supervivencia, sino también su capacidad de replicación en el interior de los fagocitos (Abbas et al. 2008f). Generalmente esta supervivencia en el interior de las células del hospedador es considerada por sí misma como uno de los principales mecanismos empleados en la evasión inmunitaria, ya que estas bacterias encuentran de este modo un lugar inaccesible para los anticuerpos circulantes, por lo que su erradicación requerirá la participación de la inmunidad celular (Abbas et al. 2008f). Sin embargo, esta estrategia evasiva ha llevado a la necesidad del desarrollo por

parte de *Ehrlichia* spp. de otra serie de mecanismos para eludir o inhibir las respuestas defensivas desencadenadas en los fagocitos, potentes células efectoras de la inmunidad innata (Barnewall et al. 1997, Zhang et al. 2004). Por lo tanto, la interacción entre *Ehrlichia* spp. y las células del hospedador resulta ser mucho más compleja que la simple satisfacción de las necesidades metabólicas de la bacteria (Zhang et al. 2004), como veremos a continuación.

Diversos estudios llevados a cabo en los últimos años han mostrado efectos de los agentes rickettsiales sobre el sistema inmunitario innato del hospedador que les permiten evadir las respuestas defensivas (Heeckeren et al. 1993, Lee & Rikihisa 1996, Barnewall et al. 1997, van Vachery et al. 1998, Reddy & Streck 1999, Mott et al. 1999, Mott & Rikihisa 2000, Harrus et al. 2003, Zhang et al. 2004, Lin & Rikihisa 2004). Así, se ha observado que *E. chaffeensis*, especie ehrlichial con tropismo por los monocitos-macrófagos y responsable de la ehrlichiosis monocítica humana (Dawson et al. 1991), es capaz de afectar a las respuestas defensivas tempranas que se desarrollan en el hospedador al actuar sobre los receptores patogénicos innatos presentes en las células del sistema mononuclear fagocitario y en las vías de señalización que son activadas tras la estimulación de dichos receptores (Lin & Rikihisa 2004). Estos hallazgos son el resultado de los estudios experimentales desarrollados por Lin y Rikihisa en una línea celular monocítica humana infectada por *E. chaffeensis* que mostraron una disminución en la expresión de ciertos PRRs, en concreto TLR-2, TLR-4 y CD14, así como de varios factores de transcripción, como PU.1 y NF- κ B, probablemente a través de su inhibición de la ruta de transducción de señales MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (Lin & Rikihisa 2004). Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo de evasión inmunitaria a través del cual *E. chaffeensis* es capaz de sobrevivir en el interior de las células del hospedador mediante la inhibición de ciertas vías de señalización responsables de la activación de funciones bactericidas asociadas a la estimulación de los PRRs de los monocitos humanos (Lin & Rikihisa 2004).

Por otra parte, las especies de la familia Anaplasmataceae han desarrollado otra estrategia que les permite impedir o, al menos, dificultar el reconocimiento inmunitario innato, al actuar sobre su expresión de dos de los PAMP de mayor importancia en la activación de diversos PRRs: a nivel genómico estas bacterias han eliminado todos los genes necesarios para la biosíntesis del LPS y muchos de los genes necesarios para la biosíntesis de peptidoglicano (Lin & Rikihisa 2003, Mavromatis et al. 2006).

Generalmente los monocitos y los macrófagos son capaces de destruir a los microorganismos invasores mediante la fusión de los endosomas que contienen las bacterias con ciertos gránulos que contienen péptidos antimicrobianos y enzimas

hidrolíticas (Abbas et al. 2008g). Sin embargo, la supervivencia en el interior del fagocito de ciertas bacterias intracelulares, entre las que se encuentran *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum*, va a depender precisamente de su habilidad para inhibir la fusión del fagosoma con los lisosomas (Barnewall et al. 1997, Mott et al. 1999, Zhang et al. 2004, Abbas et al. 2008f, Tizard 2009a). Así, se ha observado, por ejemplo, que, tras la ingestión por el macrófago, *E. chaffeensis* evita la maduración del endosoma donde reside, impidiendo la expresión de marcadores lisosomales en su superficie y, por tanto, evitando su destrucción por las enzimas contenidas en dichos lisosomas (Mott et al. 1999).

Otro de los mecanismos más comúnmente empleados por los macrófagos y neutrófilos para la destrucción de los microorganismos es la generación de especies reactivas de oxígeno (Tizard 2009q), frente a las que *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* son muy sensibles (Barnewall & Rikihisa 1994). Por lo tanto, estas bacterias han precisado desarrollar mecanismos que eviten la generación de estas especies reactivas de oxígeno, lo que han logrado mediante la inhibición de la actividad de la NADPH-oxidasa, principal sistema enzimático responsable de la generación de estas especies reactivas (Mott & Rikihisa 2000).

La infección por *Ehrlichia* spp. es capaz de actuar a nivel transcripcional sobre un amplio rango de genes del hospedador, lo que, por una parte, favorece la evasión de las respuestas inmunitarias de forma directa, al actuar sobre la síntesis de citocinas o la inhibición de la apoptosis de la célula infectada, y, por otra parte, induce cambios en la transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en procesos celulares como la biosíntesis y metabolismo, la expresión de canales de transporte iónico y la regulación de la diferenciación celular (Lee & Rikihisa 1996, Zhang et al. 2004). Así, se ha observado que la infección por *E. chaffeensis* en una línea monocítica humana altera significativamente los niveles transcripcionales del 4,5% de los genes del hospedador (Zhang et al. 2004). Entre los efectos que se desencadenan en la célula hospedadora cabe destacar el hecho de que se impide la estimulación de la transcripción de ciertas citocinas, como son IL-12, IL-15 e IL-18, implicadas en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas tempranas y las respuestas inmunitarias mediadas por células que se desarrollan frente a microorganismos intracelulares. Esta represión puede ayudar a *E. chaffeensis* a evadir las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas, ya que la secreción de dichas citocinas daría como resultado la estimulación de las células NK y Th1 para la producción de IFN- γ , que activaría a su vez a los macrófagos para destruir a las bacterias fagocitadas (Zhang et al. 2004). Del mismo modo y de forma relacionada, otros estudios han mostrado una inhibición de la síntesis de TNF- α , IL-6 y GM-CSF (de sus siglas en inglés, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y, en cambio, la expresión de bajos niveles de IL-1 β , IL-8 e IL-10 en monocitos humanos infectados por *E. chaffeensis*

(Lee & Rikihisa 1996), así como una supresión en la síntesis de citocinas inmunoestimuladoras y proinflamatorias y prostaglandinas en macrófagos de ratón infectados por otro agente de la familia Anaplasmataceae, *Neorickettsia risticii*, en respuesta al LPS de *Escherichia coli* (van Heeckeren et al. 1993).

Por otra parte, el efecto de *E. chaffeensis* a nivel transcripcional se refleja también en un incremento en la supervivencia de las células infectadas, ya que esta bacteria parece inducir la producción de ciertos inhibidores de la apoptosis (Zhang et al. 2004), al igual que se ha observado para *A. phagocytophilum* en neutrófilos humanos (Yoshiie et al. 2000). La apoptosis es uno de los mecanismos innatos de defensa del hospedador, por lo que esta inhibición supone una forma más que emplean los agentes intracelulares obligados para evadir las respuestas inmunitarias, al prevenir la destrucción de las bacterias que han sido internalizadas y evitar la muerte de estas células que han sido infectadas, con lo que la bacteria dispone de suficiente tiempo para replicarse en el interior de la célula del hospedador (Zhang et al. 2004).

Hasta el momento nos hemos centrado en los efectos que sobre el sistema inmunitario innato ejercen para evitar su destrucción por el hospedador ciertos agentes rickettsiales relacionados estrechamente con *E. canis*. Sin embargo, es importante recalcar que, en la evasión de las respuestas defensivas, estos microorganismos actúan también sobre los mecanismos efectores de la inmunidad adaptativa, no sólo por medio de una inhibición de la secreción de citocinas reguladoras de las respuestas inmunitarias, como ya se ha descrito, sino también por medio de otros mecanismos más específicos. Como veremos más adelante, estudios llevados a cabo en relación con la respuesta inmunitaria protectora frente a organismos ehrlichiales indican que el componente predominante de estas defensas parece ser una respuesta de tipo Th1, caracterizada por la secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-2, que conduce al desarrollo de una respuesta de base celular (Akkoyunlu & Fikrig 2000, Bitsaktsis et al. 2004). Sin embargo, ciertos agentes ehrlichiales, como *E. ruminantium* y *E. canis*, parecen haber desarrollado un mecanismo de evasión inmunitaria consistente en una inhibición de esta respuesta de base celular mediante la disminución de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Vachier et al. 1998, Harrus et al. 2003) e, incluso, de las de clase I (Vachier et al. 1998) en sus células diana, con lo que la presentación antigénica a los linfocitos T estaría comprometida (Vachier et al. 1998, Harrus et al. 2003).

Sin embargo, algunos autores sugieren que *E. muris*, otra especie bacteriana genéticamente relacionada con *E. canis* y cuyas células diana son también los monocitos-macrófagos, no evade la respuesta inmunitaria mediante la inhibición de la presentación

antigénica por parte de las moléculas del CMH de clase II, sino que parece que lo logran por medio de la supresión de las señales de las células T activadas (Nandi et al. 2009).

Por otra parte, los datos moleculares obtenidos por Reddy y Streck en 1999 muestran otro posible mecanismo de evasión inmunitaria en el caso de *E. chaffeensis*. La existencia de variabilidad en algunos de sus genes, en concreto en algunas proteínas antigénicas de superficie, puede dificultar el reconocimiento antigénico y, por tanto, la puesta en funcionamiento de respuestas inmunitarias adaptativas por parte del hospedador (Reddy & Streck 1999).

Todos estos mecanismos evasivos son los que van a conducir a que los agentes rickettsiales provoquen en el hospedador infecciones crónicas que pueden durar años, con recidivas y reactivaciones tras una curación aparente, que son difíciles de erradicar (Abbas et al. 2008f) y que les permiten establecer un estado de portador persistente (Waner et al. 2001).

Respuesta inmunitaria frente a *Ehrlichia* spp.

A pesar del desarrollo por parte de *Ehrlichia* spp. de las citadas estrategias para evitar ser destruidas por el hospedador, éstas no resultan totalmente eficaces y se desarrolla por parte del sistema inmunitario del animal afectado una serie de respuestas en las que están implicados tanto el sistema inmunitario innato como el adaptativo y en las que participan tanto la rama celular como la humoral.

La infección por *Ehrlichia* spp. se produce tras la picadura de la garrapata. Dicha picadura es la responsable del desarrollo de una inflamación inicial y de la liberación de mediadores químicos que atraen al foco de inflamación a las células del sistema inmunitario innato, lo que va a favorecer la infección por *Ehrlichia* spp., ya que así se logra aumentar en el punto de inoculación el número de células diana (neutrófilos o monocitos-macrófagos, según la especie ehrlichial implicada) (Rikihisa 1991).

De forma general, la inmunidad innata frente a bacterias intracelulares se inicia tras el reconocimiento de componentes bacterianos por parte de los TLR y otros PRRs, lo que desencadena una cascada enzimática que conduce hacia la estimulación de los componentes celulares que forman parte de esta rama de la inmunidad, la liberación de citocinas, la activación del complemento y el desarrollo de la inflamación (Abbas et al. 2008f, Tizard 2009a). Sin embargo, como se ha mencionado previamente, los agentes ehrlichiales parecen carecer de dos de los ligandos más importantes de los TLR, LPS y péptidoglicano (Lin & Rikihisa 2003, Mavromatis et al. 2006), por lo que estas bacterias

probablemente expresen otros PAMP diferentes que permitan iniciar las respuestas innatas. Así, Huang y colaboradores han demostrado recientemente en ensayos *in vitro* con cultivos celulares de *E. chaffeensis* la expresión de múltiples lipoproteínas (Huang et al. 2008) que podrían estimular actividades microbicidas en los monocitos y macrófagos a través del receptor TLR2 (Rikihisa 2010). Sin embargo, entre los mecanismos evasivos de las respuestas defensivas de *E. chaffeensis* destaca su capacidad para disminuir la expresión de estos TLR en la superficie de monocitos y macrófagos infectados (Lin & Rikihisa 2004), por lo que es probable que estas lipoproteínas de *E. chaffeensis* no sean capaces de estimular a las células ya infectadas, sino que actúen sobre los monocitos y macrófagos no infectados y sobre otros tipos celulares para hacerlos refractarios a la infección y promover en ellos el inicio de respuestas defensivas. Por otra parte, parece que estas lipoproteínas son necesarias para la infección de las células del hospedador por *E. chaffeensis* (Huang et al. 2008).

A pesar de que clásicamente se ha considerado que el receptor TLR4 está implicado en el reconocimiento innato del LPS de las bacterias gramnegativas, se ha observado en ensayos experimentales *in vivo* de infección por *E. chaffeensis* que los ratones con deficiencia de TLR4 muestran un retraso en la eliminación de la infección y una disminución en la síntesis de NO₂ e IL-6 por los macrófagos en comparación con los ratones *wild type* (Ganta et al. 2002), por lo que se ha sugerido que *E. chaffeensis*, y probablemente otras especies ehrlichiales, contengan otros PAMP que interaccionen con este receptor (Bitsaktsis et al. 2004, Chapes & Ganta 2008).

Una vez producida la estimulación de los receptores innatos se inicia una serie de respuestas para la destrucción de los agentes ehrlichiales, como la síntesis de citocinas, que van a estimular tanto a células del sistema inmunitario innato como del adaptativo.

En general, la protección frente a bacterias intracelulares está mediada por macrófagos, que adquieren la capacidad para destruir a las bacterias unos 10 días después del inicio de la infección y cuya respuesta suele ser inespecífica (Abbas et al. 2008f, Tizard 2009a). Generalmente esta respuesta implica mecanismos dependientes e independientes de oxígeno (Waner et al. 2001), pero en el caso de la infección por *Ehrlichia* spp. no está claro el papel que desempeñan los mecanismos oxidativos en la eliminación de estas bacterias, habiéndose descrito tanto un efecto mínimo de este mecanismo efector de las respuestas innatas (Waner et al. 2001) como un papel crítico de las especies reactivas de oxígeno dependientes de la NADPH oxidasa (Yager et al. 2005).

A pesar de que las actividades de los macrófagos y probablemente de otras células del sistema inmunitario innato, como las células NK, contribuyen a la destrucción de

Ehrlichia spp., no parece que por sí solas sean capaces de eliminar por completo al patógeno y requieren, por el contrario, de la participación de las respuestas inmunitarias adaptativas (Ganta et al. 2002, Abbas et al. 2008f).

En este sentido, la principal respuesta inmunitaria adaptativa que se desarrolla frente a las bacterias intracelulares es la inmunidad mediada por linfocitos T (Akkoyunlu & Fikrig 2000, Tizard 2009a). En el caso de las infecciones ehrlichiales, parece que el mecanismo predominante en la protección del hospedador está constituido por la inmunidad mediada por células T de tipo 1 y la secreción por parte de éstas de IFN- γ , que conducen hacia una respuesta inmunitaria de base celular (Waner et al. 2001, Bitsaktsis et al. 2004). Asimismo, recientemente se ha comenzado a describir un papel protector importante de los anticuerpos en estas infecciones, contrariamente a lo que se había asumido históricamente (Kaylor et al. 1991, Winslow et al. 2000, Yager et al. 2005). Sin embargo, como se describirá a continuación, existen resultados muy variables con respecto a los mecanismos implicados en las respuestas inmunitarias adaptativas desencadenadas en la ehrlichiosis, por lo que, en ocasiones, el papel que desempeña cada tipo celular o cada citocina en concreto puede ser confuso. Estos resultados divergentes pueden deberse al empleo en los diferentes estudios de distintos hospedadores o especies ehrlichiales y pueden reflejar mecanismos biológicos diferentes (Waner et al. 2001).

De forma general, se ha observado que el IFN- γ juega un papel importante en el control del grado de rickettsemia durante las fases tempranas de la infección *por A. phagocytophilum* en ratones (Akkoyunlu & Fikrig 2000, Martin et al. 2001) y la respuesta que se induce en estos animales es predominantemente de tipo Th1, si bien en fases más avanzadas los mecanismos que se desencadenan parecen ser independientes de IFN- γ (Akkoyunlu & Fikrig 2000). Asimismo, en la infección experimental en ratón por el agente ehrlichial recientemente aislado de una garrapata *Ixodes ovatus* (conocido como *Ixodes ovatus* ehrlichia, IOE), que, al igual que *E. canis*, posee tropismo por los monocitos y macrófagos, se observó un incremento en la susceptibilidad a la enfermedad fatal en aquellos animales deficientes para IL-12p40, IFN- γ , TNF- α o para los receptores de IFN- γ o de TNF- α , lo que demuestra la importancia de las citocinas de tipo 1 en la defensa del hospedador frente a las infecciones por estos agentes patógenos (Bitsaktsis et al. 2004).

Entre los mecanismos a través de los cuales el IFN- γ es capaz de inducir la destrucción de los microorganismos intracelulares, destacan en el caso de las infecciones ehrlichiales principalmente dos. Diferentes modelos de infección rickettsial han mostrado que el IFN- γ en asociación con el TNF- α induce un mecanismo de destrucción rickettsial en los fagocitos mediado por NO que es crítico para la supervivencia del hospedador (Feng et al. 1994). El IFN- γ también puede efectuar la destrucción de *Ehrlichia* spp. en las

células por el secuestro de arginina y/o por disminución de la expresión de receptores de superficie de transferrina y la consiguiente reducción en las reservas intracelulares de hierro (Park, Rikihisa 1991, Barnewall & Rikihisa 1994). Independientemente del mecanismo empleado por esta citocina para inducir la destrucción ehrlichial, es importante recalcar que su actuación se efectúa de forma sinérgica con el TNF- α , como fue descrito por Feng y Walker en 2004 en un modelo murino de infección por *E. muris* en el que se observó en los animales infectados un incremento en la mortalidad de hasta un 75% cuando se combinaban la neutralización de IFN- γ y de TNF- α en el mismo animal, mientras que los ratones con neutralización de una sola de las citocinas no mostraron una diferencia significativa en la mortalidad en comparación con los ratones en los que no se neutralizó ninguna (Feng & Walker 2004).

Ambas citocinas, IFN- γ y TNF- α , son dos de los principales mediadores de la inmunidad de tipo 1 y, por lo tanto, cabría esperar un papel decisivo para las células Th1 en la defensa del hospedador en la infección por estas rickettsias. En este sentido diversos estudios han mostrado la participación de estas células en la protección frente a *Ehrlichia* spp. de una forma similar a la descrita para otras infecciones por agentes intracelulares (Ganta et al. 2002, Bitsaktsis et al. 2004, Stevenson et al. 2006, Ismail et al. 2007). En 2002, Ganta y colaboradores sugirieron que las moléculas del CMH de clase II eran esenciales en la eliminación de la infección por *E. chaffeensis* en el hospedador murino, lo que conduciría a que la completa supresión de este patógeno requeriría la presencia de células TCD4+ funcionales (Ganta et al. 2002). Diferentes estudios han apoyado esta hipótesis, como, por ejemplo, los de Bitsaktsis y colaboradores en 2004 (Bitsaktsis et al. 2004) o los de Ismail y colaboradores en 2007 (Ismail et al. 2007). Ambos trabajos describen un papel crítico para el correceptor CD4, y no para el correceptor CD8, en la defensa del hospedador en la infección experimental por IOE en ratones *knockout* (Bitsaktsis et al. 2004, Ismail et al. 2007).

Sin embargo, en este punto es importante recalcar que los estudios experimentales llevados a cabo en infecciones por agentes ehrlichiales en ratones *knockout* han mostrado en ocasiones algunos resultados que varían notablemente entre los diferentes ensayos. Así, y a pesar de lo mencionado en el párrafo anterior, en base a los hallazgos de diferentes estudios, no todos los autores consultados opinan que las células T CD8+ ejerzan un mínimo papel en la defensa frente a la ehrlichiosis, sino que se ha descrito un papel esencial para estas células en las respuestas defensivas frente a *E. muris* (Feng & Walker 2004). Asimismo, Thirumalapura y colaboradores en 2008 y 2009 describieron que, tras la infección persistente por *E. muris* en ratones, se logró obtener una protección cruzada frente a la infección posterior por IOE en los mismos animales, y dicha protección se asoció con la generación y mantenimiento de respuestas mediadas por células T de

memoria tanto CD4+ como CD8+ específicas de *Ehrlichia* productoras de IFN- γ , así como con la producción de IgG séricas específicas de *Ehrlichia* (Thirumalapura et al. 2008, Thirumalapura et al. 2009). Sin embargo, de nuevo existe controversia en estos resultados, ya que otros estudios han dotado de importantes papeles a las células T CD8+ en la ehrlichiosis, pero no en la protección de los hospedadores, sino, por el contrario, en la inmunopatogenia relacionada con la enfermedad y, por lo tanto, en el daño ocasionado al hospedador por su propio sistema inmunitario (Ismail et al. 2004, Bitsaktsis & Winslow 2006, Ismail et al. 2007).

Por otra parte, estudios recientes de Bitsaktsis y colaboradores en 2007 cuestionaron el papel que ejercen las células T CD4+ y las células T CD8+, así como el de las citocinas de tipo 1, en el curso de la ehrlichiosis, al observar que ratones deficientes en células CD4+, CD8+ o moléculas del CMH de clase II desarrollaron una inmunidad protectora tras la infección por *E. muris* y permanecieron, por tanto, protegidos frente a la posterior infección con IOE del mismo modo que ocurría en los ratones normales (Bitsaktsis et al. 2007). La habilidad de los ratones para eliminar la bacteria o inducir respuesta protectora en ausencia de células TCD4+ sugiere que las células Th podrían no ser esenciales (Bitsaktsis et al. 2007).

No obstante, la hipótesis de que una respuesta inmunitaria mediada por células es necesaria para la resistencia ehrlichial está apoyada también por la observación de la formación de granulomas en el hígado de los ratones infectados por *E. chaffeensis*, que actúa impidiendo la diseminación bacteriana (Ganta et al. 2002).

Por otra parte, aunque por lo general se ha asumido que los anticuerpos no juegan ningún papel en la defensa del hospedador frente a las infecciones ehrlichiales, cada vez más datos apuntan a que esta afirmación es errónea (Kaylor et al. 1991, Messick & Rikihisa 1994, Lee & Rikihisa 1997, Sun et al. 1997, Casadevall 1998, Winslow et al. 2000, Feng & Walker 2004, Yager et al. 2005, Bitsaktsis et al. 2007). De hecho, los patógenos intracelulares para los que los anticuerpos no hayan mostrado algún tipo de protección parecen ser una minoría (Casadevall 1998).

En la infección por *E. canis* se desarrollan anticuerpos específicos IgM e IgA tras 4-7 días, mientras que las IgG, predominantemente IgG2 (Harrus et al. 2001), comienzan a detectarse en la sangre de los perros infectados a los 15 días postinfección (Weisiger et al. 1975), aunque la aparición inicial de estos anticuerpos puede depender de la dosis infectiva (Rikihisa et al. 1992).

En cuanto al papel de estos anticuerpos en la protección frente a la ehrlichiosis, éste aún no ha sido totalmente aclarado. Se ha observado que la transferencia de anticuerpos y/o suero inmune frente a diversas especies de la familia Anaplasmataceae, como *N. risticii*, *A. phagocytophilum* y *E. chaffeensis*, permite dotar a los animales infectados de una inmunidad protectora sustancial transitoria, aunque no completa, y una disminución en la carga rickettsial (Kaylor et al. 1991, Sun et al. 1997, Winslow et al. 2000). Asimismo, los resultados de Feng y Walker presentados en 2004 han confirmado que la inmunidad protectora desarrollada en ratones frente al agente ehrlichial *E. muris* está mediada por una combinación tanto de respuestas celulares como de respuestas humorales, con la síntesis de anticuerpos específicos frente a antígenos de esta bacteria (Feng & Walker 2004). Por otra parte, es importante destacar que los linfocitos B parecen no limitarse a la síntesis de inmunoglobulinas, sino que también son capaces de ejercer otras funciones en la protección del hospedador en las infecciones ehrlichiales, como pueden ser la síntesis de citocinas que modulen la respuesta inflamatoria o la estimulación de la expansión y activación de las células T CD4+ (Yager et al. 2005, Bitsaktsis et al. 2007).

El modo en que los anticuerpos frente a *Ehrlichia* spp. pueden actuar en la eliminación de la infección son variables. Los agentes ehrlichiales van a requerir un paso por el espacio extracelular antes de penetrar en las células, por lo que, en este momento, las inmunoglobulinas pueden inducir la destrucción de los microorganismos por la vía clásica de deposición del complemento y/o por opsonización (Messick & Rikihisa 1994, Winslow et al. 2000). Además, pueden interferir con la infectividad celular, al contribuir a la neutralización de la bacteria e impedir su unión e internalización en la célula hospedadora (Messick & Rikihisa 1994, Winslow et al. 2000). Una vez que la infección de la célula hospedadora se ha producido, los anticuerpos pueden actuar estimulando la citólisis de dicha célula (Winslow et al. 2000) e, incluso, ejerciendo un efecto inhibitor de la replicación intracelular del agente y estimulando actividades bactericidas (Messick & Rikihisa 1994). Asimismo, se ha observado que los anticuerpos específicos frente a *E. chaffeensis* y, más concretamente, los inmunocomplejos formados por la unión de las inmunoglobulinas con las bacterias, son responsables de la producción de citocinas proinflamatorias en los animales infectados, lo que puede causar un daño temporal en el hospedador pero que también contribuye a la puesta en funcionamiento de mecanismos antiehrlichiales mediante la activación de respuestas inmunitarias protectoras (Lee & Rikihisa 1997).

Por lo tanto, los datos de estos estudios en conjunto muestran que los anticuerpos y los linfocitos B pueden jugar un papel significativo en la eliminación de estas bacterias intracelulares obligadas durante la infección activa, aunque la inmunidad celular es necesaria para la eliminación completa de la bacteria, por lo que se requiere la

participación de forma organizada de todas las ramas de la inmunidad en la lucha frente a estos agentes intracelulares obligados (Winslow et al. 2000).

Sin embargo, el papel que desempeñan los anticuerpos en la infección por *E. canis* en concreto está menos claro. Así, los resultados obtenidos por Hess y colaboradores parecen indicar que los anticuerpos generados en la infección por *E. canis* en el perro no juegan un papel importante en la eliminación del agente, al no haberse observado diferencias en los títulos de anticuerpos entre los perros que fueron capaces de eliminar al agente del torrente sanguíneo y los que desarrollaron una infección persistente (Hess et al. 2006). Además, se ha observado que en perros infectados experimentalmente con *E. canis*, la persistencia de títulos de anticuerpos altos tras el tratamiento y eliminación del agente no mostró un valor protector cuando estos perros fueron inoculados con cepas de *E. canis* homólogas o heterólogas. Incluso, al reinfectar con cepas heterólogas a estos animales que mantenían títulos elevados, se desarrollaron cuadros más graves en comparación con el desafío con cepas homólogas (Breitschwerdt et al. 1998a).

En resumen y para facilitar la comprensión de la inmunidad desarrollada en el curso de la infección por *Ehrlichia* spp., los conocimientos actuales conducen a pensar que las células T CD4+ juegan un papel dominante en la inmunidad protectora a través de su producción de citocinas de tipo 1 y el desarrollo de una inmunidad mediada por células. En esta inmunidad protectora participan, no obstante, otros componentes del sistema inmunitario, como las células TCD8+ y la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B.

Inmunopatogenia de la EMC:

Aunque las respuestas inmunitarias desarrolladas frente a las agresiones suelen, y en principio deberían, ser beneficiosas, no siempre se consigue este objetivo, ya que pueden influir en el curso de las enfermedades sin lograr su curación e, incluso, pueden llegar a agravar el proceso (Tizard 2009a). De hecho, en muchas infecciones, la lesión y la sintomatología de la enfermedad pueden deberse a la respuesta del hospedador frente al microorganismo y a sus productos, más que al efecto del propio microorganismo (Abbas et al. 2008f).

En el caso de la EMC parece que la respuesta inmunitaria desarrollada no sólo no es eficaz, sino que puede ser la causa directa tanto del cuadro clínico como de las lesiones generadas (Kakoma et al. 1978, Reardon & Pierce 1981b, Codner et al. 1985, Harrus et al. 1999). La excesiva producción de anticuerpos junto con una respuesta celular disminuida parece influir decisivamente en la patogenia de la enfermedad (Reardon & Pierce 1981a, Harrus et al. 1999).

Algunos de los hallazgos que conducen a pensar que los mecanismos inmunitarios desarrollados por el hospedador en la EMC se encuentran directamente implicados en la patogenia de la enfermedad son la presencia de extensos infiltrados de células plasmáticas en órganos parenquimatosos y en la médula ósea, el desarrollo de hipergammaglobulinemia policlonal que no se correlaciona con los títulos de anticuerpos específicos frente a *E. canis* y la detección de anticuerpos antiplaquetarios y pruebas de autoaglutinación y de Coomb's positivas en los perros infectados experimentalmente (Reardon & Pierce 1981a, Harrus et al. 1996a, Harrus et al. 1999, Neer & Harrus 2006). Además, parece existir una disparidad entre el bajo número de microorganismos que se encuentran en la sangre y en los tejidos del hospedador en la infección por diferentes especies ehrlichiales y el número relativamente elevado de lesiones anatomopatológicas inducidas (Rikihisa 1999, Lepidi et al. 2000), especialmente en el hígado, donde se ha descrito la existencia de muerte celular en hepatocitos sin ninguna evidencia de infección ehrlichial (Lepidi et al. 2000), lo que conduce a especular que la patogenia de estas enfermedades no está causada directamente por el agente, sino que está mediada por el propio hospedador (Rikihisa 1999, Lepidi et al. 2000, Martin et al. 2001, Stevenson et al. 2006).

Como se ha descrito previamente en esta revisión bibliográfica, algunos de los signos clínicos observados en la ehrlichiosis canina se relacionan con complicaciones de la enfermedad, entre las que destaca el daño renal, que parece ser inmunomediado (Cohn 2003). Durante la fase aguda de la enfermedad se ha documentado la presencia de una nefropatía perdedora de proteínas caracterizada por la presencia de infiltrados perivenulares e intersticiales de linfocitos y células plasmáticas localizados principalmente en la corteza renal y lesiones glomerulares mínimas debidas al depósito de inmunocomplejos, lo que sugiere la implicación de la respuesta inmunitaria del hospedador (Codner et al. 1992a, Codner & Maslin 1992b). En la fase crónica de la ehrlichiosis monocítica canina se puede observar también la existencia de daño renal, aunque en este caso se asocia con el desarrollo de una glomerulonefritis con síndrome nefrótico (Frank & Breitschwerdt 1999, Neer & Harrus 2006).

Otros signos clínicos que se han asociado a menudo con la respuesta inmunitaria del hospedador más que con la acción directa del agente son los signos locomotores, debidos a polimiositis o a mono o poliartrosis por hemartrosis o deposición de inmunocomplejos, aunque por lo general estos signos son más frecuentes en infecciones por especies granulocíticas, como *E. ewingii* o *A. phagocytophilum* (Neer & Harrus 2006).

Por otra parte, varios de los signos clínicos más frecuentes en esta enfermedad, como son la fiebre, anorexia o depresión, pueden estar relacionados de forma directa con el

incremento de las concentraciones séricas de ciertas citocinas, como IL-1, IL-8 o el TNF- α , que son inducidas en un intento de resolver la infección (Unver et al. 2006, Tizard 2009o). Se ha documentado que la secreción de ciertas citocinas en el curso de la infección por *Ehrlichia* spp. puede contribuir al daño tisular inflamatorio (Lee & Rikihisa 1996, Lee & Rikihisa 1997, Dumler et al. 2000).

En el curso de la EMC la alteración hematológica más frecuentemente descrita es la trombocitopenia (Neer & Harrus 2006). Así, suele observarse la presencia de trombocitopenia y anemia y leucopenia moderadas durante la fase aguda de la enfermedad, trombocitopenia moderada durante la fase subclínica y pancitopenia durante la fase crónica grave (Harrus et al. 1997b). Estas alteraciones hematológicas parecen ser una de las principales consecuencias negativas de la respuesta del hospedador frente a la infección por *E. canis*. Así, la trombocitopenia se puede atribuir a diferentes mecanismos en los diferentes estadios de la enfermedad, y dichos mecanismos pueden actuar solos o combinados entre sí (Waner et al. 1995). Se ha observado un incremento en el consumo de plaquetas debido a cambios inflamatorios en el endotelio vascular sanguíneo (Woody & Hoskins 1991) así como un aumento en el secuestro esplénico de las plaquetas (Woody & Hoskins 1991), que se producen principalmente durante la fase aguda de la enfermedad, aunque no se limitan a esta fase (Kakoma et al. 1978). Además, se ha identificado un factor inhibidor de la migración plaquetaria que impide la formación de pseudópodos en estas células, que se redondean y tienden a agruparse, lo que puede interferir con la entrada de las plaquetas en el sistema circulatorio, con el consiguiente descenso de sus recuentos sanguíneos (Kakoma et al. 1978). Por otra parte, durante la ehrlichiosis monocítica canina se produce un incremento en la destrucción plaquetaria, principalmente en el bazo, lo que conduce a un considerable descenso en su vida media (Smith et al. 1975).

El hallazgo de la existencia de anticuerpos antiplaquetarios en el suero de perros con infección tanto experimental como natural por *E. canis* es indicativo de la existencia de un mecanismo de destrucción inmunológica de estas células (Waner et al. 1995, Harrus et al. 1996b, Grindem et al. 1999). Estos anticuerpos pueden participar también en las disfunciones plaquetares observadas en el curso de la ehrlichiosis monocítica canina (Harrus et al. 1996b). Se han detectado IgG ligadas a plaquetas en perros infectados experimentalmente por *E. canis* de forma tan temprana como a los 3 días postinfección (Waner et al. 2000a) y se ha documentado la existencia de anticuerpos antiplaquetarios en otras enfermedades infecciosas causadas por especies relacionadas, como, por ejemplo, por *Rickettsia rickettsii*, agente causal de la Fiebre de las Montañas Rocosas (Grindem et al. 1999). Asimismo, en medicina humana se ha descrito la presencia de anticuerpos antiplaquetarios en el 80% de las muestras séricas de pacientes con ehrlichiosis granulocítica humana (Wong & Thomas 1998).

La existencia de anticuerpos antieritrocitarios parece participar de la misma forma en la anemia observada en la infección por *E. canis* (Frank & Breitschwerdt 1999).

Durante la fase crónica de la ehrlichiosis monocítica canina se cree que el principal factor responsable de la trombocitopenia es un descenso en la síntesis de plaquetas debido a una hipoplasia de la médula ósea (Woody & Hoskins 1991). Dicha hipoplasia de la médula ósea parece ser la causante de la pancitopenia observada durante esta fase (Harrus et al. 1999).

Por otra parte, recientemente se ha descrito en un modelo experimental de infección por *E. muris* en ratones la existencia de alteraciones en la actividad de las células progenitoras en la médula ósea, así como el desarrollo de una hematopoyesis extramedular (MacNamara et al. 2009). Estos hallazgos sugieren que las citopenias observadas en el curso de las ehrlichiosis monocíticas pueden ser el resultado de una funcionalidad inadecuada de las células progenitoras sanguíneas por estrés hematopoyético inducido por la infección, así como del secuestro de éstas por el bazo (MacNamara et al. 2009).

Debido a la importancia del bazo en la patogenia de numerosas enfermedades, se llevó a cabo un estudio en el que se evaluó el papel que este órgano desempeña en la ehrlichiosis monocítica canina mediante la realización de una esplenectomía en perros experimentalmente infectados por *E. canis*, confirmándose la aparición de unos signos clínicos y hematológicos más leves en los perros esplenectomizados en comparación con los perros intactos (Harrus et al. 1998c). Estas diferencias sugieren que en esta enfermedad se encuentran implicados ciertos mecanismos inmunológicos y que el bazo juega un papel central en la patogenia de la ehrlichiosis canina, probablemente mediante la liberación de mediadores inflamatorios esplénicos responsables de los signos clínicos observados y mediante la producción de elevadas cantidades de anticuerpos, ya que se trata de uno de los principales órganos productores de inmunoglobulinas (Harrus et al. 1998c).

Por otra parte, se ha sugerido que *E. canis* es capaz de inducir en el perro un cierto grado de inmunosupresión, que se manifiesta principalmente con alteraciones en la inmunidad mediada por células (Greene 1995) y que podría ser responsable de la elevada frecuencia de concurrencias con otras patologías descrita en la ehrlichiosis canina (Frank & Breitschwerdt 1999, Neer & Harrus 2006).

Los resultados obtenidos en estudios experimentales de infección por *A. phagocytophilum* en ovejas han demostrado un efecto inmunosupresor de este agente (Woldehiwet 1987a, Woldehiwet 1987b, Woldehiwet 1991, Larsen et al. 1994, Gokce & Woldehiwet 1999, Whist et al. 2003). Las ovejas infectadas muestran una severa

leucopenia debida a una linfocitopenia temprana, debida a un descenso tanto de los linfocitos T CD4+, T CD8+ y T $\gamma\delta$ como de los B (Woldehiwet 1991, Whist et al. 2003), y neutropenia y trombocitopenia prolongadas (Woldehiwet 1987b). Se ha observado que este agente predispone a los animales al padecimiento de infecciones bacterianas y víricas más graves (Larsen et al. 1994) no sólo por la disminución en el número de células defensivas, sino también porque provoca alteraciones en las funciones de estas células (Woldehiwet 1987a, Woldehiwet 1987b, Larsen et al. 1994). La infección por *A. phagocytophilum* en ovejas se manifiesta tanto por una alteración en la respuesta humoral, con un descenso en la síntesis de anticuerpos en los animales infectados tras la inmunización con diferentes antígenos (Larsen et al. 1994, Whist et al. 2003) como por alteraciones en las respuestas inmunitarias celulares, con una reducida reactividad linfocitaria a la estimulación por mitógenos o antígenos (Woldehiwet 1987a, Gokce & Woldehiwet 1999, Whist et al. 2003). Además, aunque se ha descrito un descenso inicial en el número de linfocitos T CD8+, posteriormente se produce una proliferación de dicha subpoblación, llevando a una inversión del índice linfocitario CD4:CD8 (Whist et al. 2003). En medicina humana se ha observado que los pacientes afectados por ehrlichiosis aguda causada por *A. phagocytophilum* muestran una linfocitopenia predominantemente originada por apoptosis de los linfocitos T $\gamma\delta$ (Caldwell et al. 1996).

La infección por *N. risticii* en ratones parece también provocar de forma dosis dependiente una disminución marcada y aguda en las respuestas proliferativas *in vitro* de las células esplénicas ante la estimulación por mitógenos, así como una disminución en la secreción de IL-2 (Rikihisa et al. 1987).

Por otra parte, en la infección por *E. chaffeensis* se ha descrito un posible efecto inmunosupresor de algunas de la citocinas secretadas, como IL-10 (Lee & Rikihisa 1996).

Dada la similitud existente entre estas especies y *E. canis*, es probable que en el curso de la ehrlichiosis monocítica canina puedan desarrollarse algunas de las anomalías inmunosupresoras descritas en otros animales o en el hombre. Así, se han observado alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y CD8+ en la sangre de perros con ehrlichiosis tras la infección natural, que conducen a una inversión del índice CD4:CD8 (Frank & Breitschwerdt 1999, Heeb et al. 2003, Lorente et al. 2008). Heeb y colaboradores en 2003 describieron el caso clínico de un perro con infección natural por *E. canis* que presentaba alteraciones marcadas en las subpoblaciones de linfocitos T, con predominancia de los linfocitos TCD8+ y un descenso en los linfocitos TCD4+, con lo que el ratio CD4:CD8 se encontraba invertido (Heeb et al. 2003). En este caso, se describía la presencia de otra alteración en el sistema inmunitario: se observó la existencia de una

linfocitosis granular grande, que había sido descrita previamente en otros estudios de ehrlichiosis monocítica canina (Heeb et al. 2003, Neer & Harrus 2006).

A pesar de que estas alteraciones en las poblaciones linfocitarias en los perros infectados por *E. canis*, junto con la elevada frecuencia de concurrencias observadas en estos perros y las alteraciones inmunitarias descritas en otras especies animales con infecciones rickettsiales relacionadas podrían indicar la existencia de una inmunosupresión durante el curso de la ehrlichiosis monocítica canina, los conocimientos existentes por el momento no permiten confirmar esta hipótesis. De hecho, Hess y colaboradores han descrito recientemente la ausencia de cambios inmunológicos en la especie canina tras la infección experimental por *E. canis*, si bien en este estudio se observó al inicio de la infección una linfocitosis TCD8+ que posteriormente se resolvió (Hess et al. 2006). Sin embargo este trabajo se desarrolló únicamente durante las fases aguda y subaguda de la infección, por lo que no es posible descartar el desarrollo de alteraciones en los componentes del sistema inmunitario canino en fases más avanzadas de la enfermedad, como sugieren los propios autores (Hess et al. 2006).

Por otra parte, el incremento en la subpoblación de linfocitos TCD8+ ha sido descrito en el curso de la infección por especies ehrlichiales y se ha asociado en ocasiones con la inmunopatogenia de la enfermedad. Así, se ha sugerido que las células T CD8+ pueden ser responsables directamente del desarrollo de una enfermedad fatal en ratón tras la infección con IOE (Bitsaktsis & Winslow 2006, Ismail et al. 2007). Las células T CD8+ pueden ser capaces de mediar esta respuesta fatal iniciando directamente respuestas inflamatorias patológicas dependientes de TNF- α o ejerciendo una acción inmunosupresora, al inhibir la acción de los linfocitos T CD4+ (Bitsaktsis & Winslow 2006). Así, se ha descrito que las células T CD8+ median el desarrollo de un shock tóxico inducido por *Ehrlichia* que se asocia con una sobreproducción de IL-10 y TNF- α y apoptosis de células T CD4+ (Ismail et al. 2007).

Finalmente, cabe destacar que la respuesta inmunitaria individual del hospedador también parece ser esencial en el desarrollo del cuadro clínico. En concreto, se ha descrito que el Pastor Alemán podría ser una raza más susceptible a desarrollar formas de EMC más graves y con peor pronóstico que otras razas (Nyindo et al. 1980, Harrus et al. 1997b, Neer & Harrus 2006). Las variaciones en la susceptibilidad a esta enfermedad podrían deberse a diferencias raciales en la habilidad para desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada. En este sentido, se ha observado que los Pastores Alemanes presentan una respuesta inmunitaria celular frente a *E. canis* deprimida en comparación con la desarrollada por perros de raza Beagle (Nyindo et al. 1980).

2.4. LA DOXICICLINA

El sistema inmunitario puede verse afectado por una gran diversidad de fármacos que actúan principalmente a través de mecanismos inmunosupresores, inmunoestimulantes y de generación de tolerancia inmunitaria (Krensky et al. 2007). La utilización de estas propiedades en la regulación de las respuestas inmunitarias puede resultar en muchas ocasiones beneficiosa en el tratamiento de diferentes condiciones patológicas o en la prevención del rechazo inmunitario de órganos trasplantados (Krensky et al. 2007, Rang et al. 2008b).

Los inmunosupresores de mayor importancia en la actualidad pueden ser clasificados en cuatro categorías principales: los glucocorticoides, los inhibidores de la calcineurina (como la ciclosporina o el tacrolimus), los antiproliferativos/antimetabólicos de las células inmunitarias (como el sirolimus, la azatioprina o el micofenolato de mofetilo) y los agentes biológicos o preparados de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos a células T (como la globulina antitimocítica o el anticuerpo monoclonal anti-CD3 antihumano de tipo IgG2a murino) (Krensky et al. 2007, Rang et al. 2008b).

Estos fármacos inmunosupresores presentan una serie de efectos indeseables, como el riesgo de infecciones por agentes oportunistas o el desarrollo de neoplasias. Esto ha hecho que a menudo se empleen en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o en los trasplantes de órganos otras sustancias que lo que permiten es obtener tolerancia inmunitaria evitando la reacción específica dirigida a un antígeno. A modo de ejemplo, podemos destacar que es posible inducir tolerancia mediante la inhibición de la señal coestimulante en la presentación antigénica a través del empleo de la molécula de proteína de fusión de tipo recombinante, CTLA4Ig, y anticuerpos monoclonales anti-CD80, CD86 o ambos (Krensky et al. 2007).

Las sustancias que son capaces de ejercer un efecto inmunoestimulador y, por tanto, ser empleadas en el tratamiento de infecciones o inmunodeficiencias, son por lo general menos conocidas y estudiadas. Entre ellas podemos destacar las citocinas recombinantes (interferones, IL-2...). Asimismo, se pueden incluir en este grupo de fármacos con propiedades inmunoestimulantes las vacunas, que permiten obtener una inmunización activa frente a antígenos concretos, y las inmunoglobulinas, administradas para lograr una inmunización pasiva (Krensky et al. 2007).

Las sustancias mencionadas por el momento son fármacos empleados precisamente por sus efectos sobre la respuesta inmunitaria. Sin embargo, cada vez más fármacos que no han sido tradicionalmente considerados ni inmunosupresores, ni inmunoestimulantes, ni que induzcan tolerancia inmunitaria, han mostrado poseer efectos no específicos sobre el sistema inmunitario.

Entre estas sustancias cabe destacar un amplio grupo de agentes antimicrobianos, que incluyen agentes β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, fluoroquinolonas y tetraciclinas, y que pueden actuar sobre el sistema inmunitario principalmente a través de tres mecanismos (Jiménez-Valera et al. 1997, Hamilton-Miller 2001, Pasquale & Tan 2005, Tauber & Nau 2008):

- Actuando directamente sobre los componentes del sistema inmunitario.
- Induciendo el desarrollo de cambios sobre la superficie de los microorganismos patógenos, haciendo que sean más susceptibles a los mecanismos efectores de la inmunidad.
- Causando la lisis de los microorganismos, con lo que se liberan componentes microbianos que pueden actuar directamente sobre el sistema inmunitario del hospedador.

A continuación nos centraremos en los aspectos más relevantes de uno de estos fármacos antimicrobianos, la doxiciclina, y la familia a la que pertenece, las tetraciclinas.

Las tetraciclinas son un grupo de fármacos con actividad bacteriostática que fueron aislados a partir de *Streptomyces aureofaciens* y descritas en 1948 por Benjamin M. Duggar (Duggar 1948). Se trata de un grupo de compuestos anfóteros que derivan de la naftacenocarboxamida policíclica, núcleo tetracíclico, de donde reciben su nombre (Riviere & Spoo 2001, Chambers 2007).

Desde su descubrimiento la molécula original ha sufrido numerosas modificaciones estructurales, dando lugar a otras tetraciclinas semisintéticas con propiedades farmacocinéticas y actividades antimicrobianas diferentes (Riviere & Spoo 2001).

Una de las tetraciclinas de mayor relevancia en la actualidad es la doxiciclina, tetraciclina semisintética que es sintetizada a partir de la oxitetraciclina o la metaciclina y que presenta una mayor liposolubilidad que otros miembros de su familia, lo que le permite una mayor penetración dentro de las células, confiriéndole una mayor actividad frente a microorganismos intracelulares (Riviere & Spoo 2001).

2.4.1. EFECTOS EN LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y MECANISMO DE ACCIÓN

De forma general, las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que poseen actividad contra una gran variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas, aerobias y anaerobias, intracelulares y extracelulares (Riviere & Spoo 2001, Chambers 2007, Rang et al. 2008a). Asimismo, son eficaces frente a algunos agentes patógenos resistentes a antimicrobianos activos contra la pared bacteriana, como ciertos agentes pertenecientes al Orden Rickettsiales (Chambers 2007, Rang et al. 2008a). Debido a su actividad antimicrobiana de amplio espectro, estos fármacos se encuentran entre los antibióticos más prescritos tanto en medicina humana como en veterinaria.

Además, diversos estudios en el hombre han mostrado que la doxiciclina puede poseer cierta eficacia en el tratamiento de algunas enfermedades parasitarias causadas por protozoos, como la malaria o la leishmaniosis cutánea (Dahl et al. 2006, Masmoudi et al. 2008, Briolant et al. 2010, Griffin et al. 2010). Se ha sugerido, incluso, que una combinación de doxiciclina e ivermectina puede ser eficaz en el tratamiento de una nematodosis, la causada por *Dirofilaria immitis* en el perro (Grandi et al. 2010).

Estas sustancias ejercen su acción antibacteriana mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de los microorganismos sensibles, con lo que impiden la unión del ARNt aminoacídico al sitio aceptor en el complejo ARNm-ribosoma e inhiben así la síntesis proteica y, por tanto, el crecimiento y multiplicación de los microorganismos (Hash et al. 1964, Day 1966, Geigenmuller & Nierhaus 1986, Riviere & Spoo 2001, Chambers 2007).

2.4.2. FARMACOCINÉTICA

La administración de la doxiciclina y demás tetraciclinas puede realizarse por vía intravenosa, pero, en general, la administración por vía oral es la ruta preferida en la mayoría de los animales (Riviere & Spoo 2001). La absorción en el tracto gastrointestinal puede variar dependiendo de la especie animal y del tipo de formulación empleada, si bien en el caso de la doxiciclina y la minociclina la absorción es prácticamente del cien por cien (Chambers 2007). Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos compuestos quelan con facilidad los cationes bivalentes, por lo que su absorción disminuye si se administran junto con productos lácteos, sales de calcio, magnesio, hierro o zinc, geles de hidróxido de aluminio, subsalicilato de bismuto, etc. (Riviere & Spoo 2001, Chambers 2007).

La vida media de la doxiciclina varía en las diferentes especies animales, habiéndose descrito en la especie canina una vida media de 10 a 12 horas (Wilson et al. 1988), algo inferior a la descrita en el hombre (de 16 a 18 horas) (Chambers 2007) y muy superior a la del ratón, de tan solo 4 horas (Bellahsene & Forsgren 1985).

Una vez absorbidas, las diferentes tetraciclinas se unen a las proteínas plasmáticas y se distribuyen extensamente en la mayoría de los tejidos, acumulándose en las células reticuloendoteliales de hígado, bazo, médula ósea, riñones y en los huesos y dentina y esmalte de los dientes en crecimiento (Riviere & Spoo 2001, Chambers 2007, Rang et al. 2008a). A pesar de la buena distribución descrita para las tetraciclinas, existen diferencias entre los distintos compuestos de este grupo de antimicrobianos y la distribución de cada una de estas sustancias en concreto dependerá de su solubilidad lipídica, lo que provoca que algunas tetraciclinas penetren mejor en ciertos tejidos que otras. Este es el caso de la doxiciclina y de la minociclina, que poseen una liposolubilidad cinco a diez veces mayor que el resto de tetraciclinas y, por tanto, penetran mejor en los tejidos (como cerebro, líquido cefalorraquídeo y próstata) y poseen un mayor volumen de distribución y mejores propiedades antimicrobianas globales (Riviere & Spoo 2001).

La excreción de la doxiciclina se efectúa en su mayor parte con las heces en una forma inactiva, a diferencia de lo que se observa en otras tetraciclinas, en las que aproximadamente el 60% de la dosis es eliminada por filtración glomerular (Riviere & Spoo 2001, Chambers 2007). Esta característica es la responsable de que la doxiciclina ejerza un menor número de efectos adversos, o que produzca efectos secundarios menos marcados que otros miembros de su familia. En concreto, se ha observado que este fármaco induce menos efectos gastrointestinales que otras tetraciclinas, siendo el efecto secundario más comúnmente descrito para esta familia antimicrobiana tanto en animales como en el hombre la aparición de una irritación gástrica e intestinal. No obstante, se ha descrito que, en ocasiones, la doxiciclina puede provocar náuseas y vómitos en perros y gatos, por lo que se recomienda su administración junto con alimento, lo que reduce este efecto adverso. Por otra parte, el uso de la mayoría de las tetraciclinas está desaconsejado en animales con insuficiencia renal, precisamente por esa eliminación por filtración glomerular descrita previamente y que no comparte la doxiciclina. La eliminación de la doxiciclina en forma de conjugado inactivo con las heces hace que pueda ser empleada incluso en perros con una afectación renal (Riviere & Spoo 2001).

Otros efectos adversos de las tetraciclinas que cabe destacar son la aparición de decoloración de los dientes en crecimiento si son administradas durante el embarazo o durante los primeros meses de vida, debido a la quelación del calcio en la dentina o el esmalte, y el retardo del desarrollo óseo, aunque la doxiciclina parece ejercer estos efectos

de forma mucho menos probable que otras tetraciclinas (Riviere & Spoo 2001). También se ha descrito el desarrollo de fototoxicidad en el hombre tras la administración de estos fármacos y, probablemente, también puede aparecer este efecto en otras especies animales. Otros riesgos de la administración de tetraciclinas son las superinfecciones y, si son administradas por vía intravenosa rápida, el colapso circulatorio (Riviere & Spoo 2001).

Como se ha comentado, estas sustancias poseen unas excelentes propiedades antimicrobianas para un amplio espectro de agentes infecciosos y, sin embargo, como ocurre en el caso de otros antibióticos, algunas bacterias han sido capaces de desarrollar mecanismos de resistencia frente a ellas, que se transmiten generalmente a través de plásmidos o transposones (Roberts 1996, Schwarz & Chaslus-Dancla 2001). Entre los diferentes mecanismos de resistencia a la acción de las tetraciclinas desarrollados destacan el eflujo dependiente de energía del fármaco, que es mediado por proteínas transmembrana, la protección del ribosoma de la actuación de la tetraciclina, en la que participan diferentes tipos de proteínas, y la inactivación enzimática de las tetraciclinas (Speer et al. 1992, Roberts 1996, Taylor & Chau 1996, Schwarz & Chaslus-Dancla 2001).

2.4.3. EFECTOS NO ANTIMICROBIANOS

Como se ha comentado previamente, la excelente actividad antimicrobiana de la doxiciclina y de otras tetraciclinas no es la única característica que ha hecho que sean tan populares, sino que, de forma temprana tras su descubrimiento, se comenzaron a describir otras propiedades de estos fármacos que son independientes de su efectos antimicrobianos y que hacen que en la actualidad existan más de 130 ensayos clínicos en marcha evaluando su posible empleo como inmunomoduladores o antiinflamatorios en patologías tan dispares como la artritis reumatoide, la periodontitis, enfermedades dermatológicas de base inmunomediada o ciertos tipos de neoplasias (Tauber & Nau 2008, Griffin et al. 2010).

Ya en 1950 se comenzaron a describir en la bibliografía ciertos efectos de las tetraciclinas sobre el sistema inmunitario tanto innato como adaptativo, considerándose en un principio estas características como un efecto secundario indeseable de aquellos antimicrobianos que habían sido descubiertos recientemente (Muñoz & Geister 1950, Forsgren et al. 1974, Thong & Ferrante 1979). Se observó que algunas funciones de los leucocitos polimorfonucleares podían verse inhibidas por las tetraciclinas, como la quimiotaxis, la fagocitosis, la degranulación o la destrucción de los microorganismos fagocitados (Forsgren et al. 1974, Forsgren & Schmeling 1977, Welch et al. 1981, Gabler & Creamer 1991). También se describió para las tetraciclinas un efecto inhibitor de la generación de radicales libres de oxígeno por parte de los neutrófilos (Gabler & Creamer

1991), lo que influiría en los mecanismos de eliminación de los agentes patógenos. Se ha sugerido que estos efectos inhibidores sobre las funciones de los neutrófilos podrían estar mediados, al menos en parte, por la quelación de cationes divalentes, especialmente Mg^{2+} y Ca^{2+} (Kloppenburger et al. 1995a).

Las tetraciclinas también ejercen algunos efectos sobre la proliferación y actividad de los linfocitos sanguíneos. Así, Thong y Ferrante en 1979 observaron en estudios experimentales *in vitro* que la doxiciclina y, en menor medida, la tetraciclina y la oxitetraciclina eran capaces de ejercer un potente efecto inhibitorio de las respuestas linfoproliferativas inducidas por mitógenos en linfocitos humanos (Thong & Ferrante 1979). En modelos *in vivo*, se ha descrito una disminución de las respuestas de base celular en ratones a los que se les habían administrado tetraciclinas, efecto especialmente marcado con la doxiciclina (Thong & Ferrante 1980), así como una inhibición de la proliferación de las células T en ratas tras la administración de oxitetraciclina, no observándose este efecto en la población de células B sanguíneas (Van den Bogert & Kroon 1982).

Posteriormente, se ha descrito una inhibición dosis-dependiente de la proliferación de células T tras la adición de minociclina o doxiciclina en cultivos celulares que se acompaña de una reducción en la producción de diferentes citocinas por parte de estas células, concretamente de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ e IL-2, así como de una disminución en la respuesta frente a IL-2 en los linfocitos T (Kloppenburger et al. 1995b). Otras citocinas cuya síntesis parece resultar afectada por las tetraciclinas son la IL-1 y la IL-6 (Milano et al. 1997, Zanjani et al. 2006). Del mismo modo, se ha descrito una disminución en los niveles en sangre de las citocinas derivadas de células T $IFN-\gamma$ e IL-10, así como de la citocina inflamatoria $TNF-\alpha$ en pacientes con infección por *Orientia tsutsugamushi* tras la administración terapéutica de doxiciclina (Chung et al. 2008). No obstante, es importante señalar que los efectos que estas sustancias ejercen sobre la síntesis de estos mediadores inmunitarios no son iguales en todos los tipos celulares, habiéndose descrito, al contrario que para los linfocitos T, un efecto inmunoestimulante para los monocitos/macrófagos (Kloppenburger et al. 1996).

El mecanismo por el que se produce esta inhibición de las funciones linfocitarias no se encuentra claramente definido, habiéndose propuesto varias hipótesis que podrían explicarlo. Así, se ha sugerido que la interferencia en la síntesis proteica mitocondrial (Van den Bogert & Kroon 1982) o el efecto de las tetraciclinas como agentes quelantes de cationes divalentes sobre los niveles intracelulares de calcio en los linfocitos (Kloppenburger et al. 1995b) pueden estar relacionados con esta inhibición. Por otra parte, se ha observado que la doxiciclina es capaz no solo de inhibir la proliferación de los linfocitos T, sino

también de inducir la eliminación de estas células mediante apoptosis mediada por la interacción Fas/Fas ligando (Liu et al. 1999).

La actividad de las tetraciclinas sobre las poblaciones linfocitarias no se centra únicamente en los linfocitos T. En este sentido, Kuzin y colaboradores describieron en 2001 que la doxiciclina presenta efectos específicos sobre los linfocitos B, bloqueando selectivamente algunas de las actividades características de los linfoblastos activados y de las células B diferenciadas. Así, se ha descrito que la doxiciclina es capaz de suprimir la secreción de inmunoglobulinas y el cambio de clase en las células B *in vitro* (Kuzin et al. 2001). Sin embargo, la influencia de las tetraciclinas sobre la síntesis de inmunoglobulinas *in vivo* es controvertida, habiéndose descrito tanto una supresión de la síntesis de anticuerpos (Bellahsene & Forsgren 1985) como la ausencia de efecto de estas sustancias sobre las respuestas humorales en modelos experimentales (Thong & Ferrante 1980).

Entre todas las propiedades no antimicrobianas de las tetraciclinas probablemente la mejor caracterizada sea su habilidad para inhibir a las metaloproteinasas (MMPs), familia de endopeptidasas dependientes de zinc que están implicadas en numerosos procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario y la remodelación de tejidos, pero cuya desregulación participa también en la patogenia de ciertos procesos patológicos, entre ellos las neoplasias, la enfermedad periodontal y la artritis reumatoide (Griffin et al. 2010). Las MMPs se han clasificado históricamente en función de la especificidad de su sustrato en colagenasas (que incluyen, entre otras, las MMP-1, 8 y 13), gelatinasas (MMP-2 y 9), estromelinas (MMP-3, 7, 10 y 11) y matrilinas, pero actualmente se clasifican en función de la estructura de la enzima en cinco grupos de MMPs secretadas y tres de MMPs asociadas a la membrana (MT-MMP) (Egeblad & Werb 2002).

Desde los estudios de Golub y colaboradores a principios de los años 80 en los que se describía la actividad de la minociclina como inhibidora de la colagenolisis en las encías de ratas con diabetes inducida experimentalmente y en fluido gingival de pacientes con enfermedad inflamatoria periodontal (Golub et al. 1983), numerosos estudios han demostrado esta actividad supresora de las tetraciclinas sobre diferentes MMPs, como MMP-2, 8, 9, 12 o 13 (Golub et al. 1987, Suomalainen et al. 1992, Hanemaaijer et al. 1997, Seftor et al. 1998a, Golub et al. 2001, Lee et al. 2001, Grenier et al. 2002, Fiotti et al. 2009, Roomi et al. 2010). Se ha observado que estos fármacos son capaces de inhibir la actividad de MMPs intersticiales de una gran variedad de fuentes celulares y tisulares, como las originadas en neutrófilos, macrófagos, osteoblastos, condrocitos o células tumorales, o las que se hallan en piel o córnea (Kloppenburger et al. 1995a). Sin embargo, se ha sugerido que las enzimas que parecen estar implicadas de forma más directa en los

procesos fisiológicos de remodelado y reparación tisular, como la MMP-1, podrían ser más resistentes al efecto inhibitor de las tetraciclinas (Suomalainen et al. 1992).

El mecanismo por el que las tetraciclinas son capaces de inhibir las MMPs no ha sido aún completamente dilucidado aunque se cree que ejercen sus efectos antiproteolíticos tanto por la inhibición directa de las MMPs como por la inhibición de su expresión (Griffin et al. 2010). La inhibición directa de las MMPs parece estar mediada por la interacción entre la molécula de la tetraciclina e iones metálicos en la propia MMP, ya que la supresión de estas enzimas puede revertirse por la adición de Ca^{2+} o Zn^{2+} (Golub et al. 1983, Golub et al. 1987, Griffin et al. 2010). Se ha observado que las tetraciclinas modificadas químicamente (CMT), que han perdido su capacidad antimicrobiana al eliminarse el grupo dimetilamino de la posición C4 del anillo A, mantienen sus propiedades antiproteolíticas, por lo que ambas propiedades parece que son independientes entre sí y dependen de regiones diferentes de la molécula del fármaco (Golub et al. 1987, Acharya et al. 2004). Esta característica podría ser beneficiosa de cara a la utilización a largo plazo del grupo de las tetraciclinas en enfermedades no infecciosas, ya que mediante el empleo de estas CMT sin actividad antibiótica se podría evitar la aparición de resistencias bacterianas a estas sustancias (Golub et al. 1987).

La eficacia de la inhibición de estas enzimas por una tetraciclina en concreto depende tanto de las características de la tetraciclina como de la MMPs y del pH, aunque el mecanismo por el que existen estas diferencias es desconocido (Golub et al. 1991, Griffin et al. 2010).

La supresión de ciertas MMPs es beneficiosa en muchos procesos patológicos en los que la proteólisis de la matriz extracelular contribuye a la patogenia y en las que se han encontrado niveles elevados de estas enzimas, como en enfermedades de base inflamatoria y/o tumoral (Griffin et al. 2010), lo que ha justificado el estudio del posible empleo de las tetraciclinas en un gran número de enfermedades tanto en animales como en el hombre. Entre estos estudios destacan los llevados a cabo en modelos de artritis reumatoide y osteoartritis, en los que se ha confirmado que en cultivos de células sinoviales reumatoides obtenidos de pacientes con esta patología las tetraciclinas (más concretamente doxiciclina, CMT-1 y CMT-3) actúan inhibiendo la invasión de la matriz del cartílago por estas células y la actividad catalítica de la MMP-8, así como su síntesis al disminuir la expresión de mRNA de esta MMP (Hanemaaijer et al. 1997, Seftor et al. 1998a). Asimismo, se ha descrito en la bibliografía que el empleo de minociclina en medicina humana en pacientes con artritis reumatoide podría ser beneficioso (Tilley et al. 1995, O'Dell et al. 1999), así como el uso de doxiciclina para el tratamiento de osteoartritis en el perro (Nganvongpanit et al. 2009).

Son también numerosos los trabajos llevados a cabo en medicina humana evaluando el papel de las tetraciclinas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias periodontales, habiéndose mostrado resultados favorables a este respecto, con disminución de la colagenolisis en los tejidos blandos y disminución de la resorción ósea (Golub et al. 1983, Golub et al. 2001, Grenier et al. 2002, Golub et al. 1991, Ramamurthy et al. 1998b).

En cuanto al posible empleo de las tetraciclinas en terapias anticancerígenas, hasta el momento se han documentado resultados prometedores en la reducción de la capacidad invasiva y de metástasis en líneas celulares humanas de melanoma, adenocarcinoma de colon, fibrosarcoma y cáncer cervical y ovárico, así como en modelos experimentales *in vivo* de cáncer de mama (Seftor et al. 1998b, Lee et al. 2001, Duivenvoorden et al. 2002, Roomi et al. 2010).

Por otra parte, se ha observado en modelos experimentales de úlceras corneales estériles en conejo que la administración de tetraciclina sistémica es capaz de reducir dicha ulceración (Seedor et al. 1987). Asimismo, la aplicación tópica de las tetraciclinas podría ser beneficiosa en el tratamiento de heridas crónicas, al haberse detectado una normalización de la curación de las heridas en ratas diabéticas tras la aplicación de CMT-2 (Ramamurthy et al. 1998a). Otros trabajos que cabe destacar evalúan el papel neuroprotector de estas sustancias en patologías neurodegenerativas, así como su uso en el tratamiento temprano de patologías cardíacas (Zanjani et al. 2006, Familian et al. 2007, Rizzi et al. 2010).

Además de esta actividad sobre las metaloproteinasas, se ha constatado que las tetraciclinas presentan otras propiedades que pueden ayudar a sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. En este sentido, se ha observado que las tetraciclinas dan lugar a una disminución específica de los niveles de la sintasa de óxido nítrico (NOS) al inhibir la expresión de ARNm de NOS, así como a una disminución en la producción de NO. Se ha sugerido que esta habilidad de las tetraciclinas para actuar sobre el NO podría ser la responsable, al menos de forma parcial, de la amplia variedad de propiedades que han demostrado poseer estas sustancias (Amin et al. 1996, Milano et al. 1997, Amin et al. 1997, D'Agostino et al. 1998). Además, ciertas CMT son capaces de inhibir no sólo la producción de NO, sino también de prostaglandina E2 en diferentes tipos celulares activados (Patel et al. 1999). A estos efectos sobre el NO y prostaglandina habría que añadir los efectos descritos previamente de las tetraciclinas sobre otros mediadores proinflamatorios, como TNF- α , IL-1 o IL-6, por parte de las células del sistema inmunitario (Kloppenborg et al. 1995b, Milano et al. 1997).

A pesar de la descripción en la bibliografía de esta amplia variedad de propiedades de la doxiciclina y demás tetraciclinas y de la existencia de un elevado número de trabajos en marcha evaluando estas sustancias para su empleo basado en sus funciones no antimicrobianas en patologías inflamatorias, inmunomediadas o tumorales en medicina humana, en veterinaria las referencias bibliográficas que pueden encontrarse se centran básicamente en el empleo de estas sustancias por su papel como antimicrobianos.

3. OBJETIVOS

Los conocimientos existentes en la actualidad sobre la inmunopatogenia y la respuesta inmunitaria desarrollada en perros infectados por *E. canis* son escasos y, en algunos casos, contradictorios. Este hecho nos condujo al inicio de este trabajo de investigación a proponernos como principal objetivo la caracterización de las poblaciones linfocitarias en los perros afectados por esta enfermedad.

Sin embargo, debido a la existencia de un escaso número de trabajos previos que hubiesen evaluado las subpoblaciones linfocitarias en el perro y a la ausencia de unos valores de referencia que pudiesen servir de ayuda a la hora de analizar las alteraciones de estas poblaciones celulares en diversas enfermedades, se hizo imprescindible comenzar el estudio estableciendo unos valores de referencia propios para el inmunofenotipo en la especie canina. Asimismo, fue necesario evaluar si estos valores podían estar influenciados por ciertas variables, como la edad, la raza o el sexo. El establecimiento de dichos valores de referencia permitiría valorar si los perros con EMC mostraban alguna modificación en comparación con los perros sanos, así como evaluar las alteraciones más frecuentes de las poblaciones linfocitarias en perros con otras enfermedades, tales como patologías oncológicas, traumatológicas, digestivas o mucocutáneas (incluyendo en estas últimas las enfermedades oftalmológicas, dermatológicas y de la cavidad oral).

Además, y dado que se trataba de estudiar el sistema inmunitario en la especie canina, se consideró necesario evaluar, además del inmunofenotipo, la síntesis de citocinas, en concreto IFN- γ y TNF- α , clásicamente consideradas citocinas de las respuestas inmunitarias de tipo 1, e IL-6 e IL-10, consideradas citocinas de las respuestas de tipo 2.

Por otra parte, con la finalidad de evaluar la respuesta inmunitaria desarrollada en el curso del tratamiento de la EMC, perros diagnosticados de esta enfermedad fueron tratados con doxiciclina a la dosis y con la duración del tratamiento recomendadas por el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM), es decir, 10 mg/kg/24horas durante 28 días, y fueron sometidos a una serie de controles periódicos para poder evaluar a corto y medio plazo (hasta 6 meses) la evolución de sus poblaciones linfocitarias y de la síntesis de citocinas. En el caso de haberse observado alteraciones en el inmunofenotipo o concentración de citocinas en sangre de estos perros, la realización de estos controles permitiría evaluar si estas alteraciones se normalizaban o no tras la terapia, o bien acontecían otras modificaciones.

A su vez, y debido a la descripción de que la doxiciclina podría poseer efectos inmunomoduladores, se decidió llevar a cabo estos mismos controles periódicos en un grupo de perros sanos a los que se les administraría este fármaco a la misma dosis y durante el mismo tiempo que lo previsto para los perros con EMC, con el fin de comprobar si estos potenciales efectos sobre el sistema inmunitario se reflejaban en las poblaciones linfocitarias y en la síntesis de citocinas. De esta forma nos proponíamos evaluar el efecto de la doxiciclina sobre el sistema inmunitario (inmunofenotipo y síntesis de citocinas) tanto en perros sanos como en perros con ehrlichiosis y comparar esta respuesta entre ambos grupos.

Por lo tanto, podemos concretar los objetivos específicos planteados en este trabajo de investigación en los siguientes:

1. Establecer los valores de referencia de las subpoblaciones linfocitarias sanguíneas (inmunofenotipo) en la especie canina mediante el empleo de citometría de flujo y determinar la concentración en sangre periférica de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10.
2. Evaluar las posibles variaciones existentes en el inmunofenotipo y concentración de dichas citocinas en la especie canina en función de variables fisiológicas como la edad, el sexo o la raza.
3. Caracterizar el inmunofenotipo y determinar la concentración plasmática de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 en perros con EMC.
4. Evaluar la posible existencia de diferencias en el inmunofenotipo y la concentración de dichas citocinas entre los perros con EMC y los perros sanos.
5. Evaluar las posibles diferencias existentes en el inmunofenotipo y concentración plasmática de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 entre las fases subclínica y clínicas (aguda o crónica) de la enfermedad.
6. Comparar los valores del inmunofenotipo y de los parámetros biopatológicos rutinarios en los perros con EMC con los valores obtenidos en perros con otras enfermedades.

7. Evaluar la evolución a lo largo del tiempo del inmunofenotipo, secreción de citocinas y valores hematológicos y de la bioquímica sanguínea en perros sanos tras la administración de doxiciclina (durante 28 días a dosis 10 mg/kg/24horas).

8. Valorar la evolución a lo largo del tiempo del inmunofenotipo, secreción de citocinas, valores hematológicos y de la bioquímica sanguínea en perros con EMC tras el tratamiento con doxiciclina y compararla con la evolución en perros sanos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. PLAN DE TRABAJO

Con la finalidad de alcanzar los objetivos descritos previamente se estableció el siguiente plan de trabajo, que se describirá en forma de bloques para facilitar su comprensión:

En primer lugar, fue necesario seleccionar los animales que se incluirían en los diferentes grupos (perros sanos, con ehrlichiosis o con otras patologías). Dicha selección de animales se llevó a cabo de forma secuencial en el tiempo, alargándose este estudio longitudinal durante más de dos años.

La inclusión de los animales en un grupo o en otro se basó en una serie de criterios de inclusión o exclusión que se describirán con detalle posteriormente, pero entre los que cabe destacar el papel fundamental de las técnicas de diagnóstico de ehrlichiosis empleadas. Asimismo, debido a que nuestra zona geográfica es una zona considerada como endémica para la leishmaniosis canina, otra enfermedad que se ha descrito que puede alterar el sistema inmunitario de los perros afectados, todos los animales de este trabajo, independientemente del grupo en el que finalmente fuesen incluidos, debían ser considerados negativos para esta patología.

En los controles realizados a cada uno de los perros del estudio se llevaron a cabo una anamnesis y exploración física completas y la extracción de muestras de sangre para la realización de hematología y bioquímica sanguíneas, citometría de flujo, IFI y PCR frente a *E. canis* y *L. infantum* y determinación de la concentración de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α .

Con los resultados obtenidos se procedió, en primer lugar, al establecimiento de unos valores de referencia para los parámetros biopatológicos analizados en los perros sanos de nuestro trabajo para, a continuación, determinar los valores medios de estos mismos parámetros en los perros con EMC y los perros con otras patologías.

Todos estos resultados permitieron realizar posteriormente un estudio comparativo de la hematología y la bioquímica sanguíneas, el inmunofenotipo y la concentración de las citocinas plasmáticas mencionadas entre los diferentes grupos de animales.

Además, debido a los potenciales efectos inmunomoduladores atribuidos a la doxiciclina, se planteó la realización de un ensayo clínico mediante el cual se trataría de evaluar el efecto de la administración de este fármaco sobre el sistema inmunitario canino, tanto en perros afectados de EMC, enfermedad en la que está indicado el tratamiento con doxiciclina, como en perros sanos.

Para ello, se organizó el plan de tratamiento con doxiciclina en los perros con EMC y en los perros sanos a los que se podría administrar el fármaco, así como los controles a realizar para poder evaluar posteriormente la evolución de los diferentes parámetros analizados en este estudio a lo largo del tiempo. En total, de cada uno de los animales a los que se les administró doxiciclina, se llevaron a cabo 4 controles (los días 0, 30, 90 y 180, considerando como día 0 el día del inicio del tratamiento). En dichos controles se realizaron una anamnesis y exploración física completas, así como la extracción de muestras de sangre, para la determinación de los parámetros biopatológicos estudiados en este trabajo.

Con los datos referentes a los controles realizados a lo largo del tiempo se llevó a cabo un estudio del efecto de la administración de doxiciclina sobre el inmunofenotipo, la concentración de citocinas plasmáticas, la hematología y la bioquímica sanguíneas en los perros sanos, así como una evaluación de las respuestas de los citados parámetros en los perros con ehrlichiosis tras el tratamiento con este fármaco.

Posteriormente, se comparó la evolución de estos parámetros entre los perros sanos y los perros con ehrlichiosis tras la administración de doxiciclina.

4.2. ANIMALES

En este trabajo de investigación han sido incluidos finalmente un total de 167 perros de diferentes procedencias. La selección de los animales y la recogida de muestras comenzaron en noviembre de 2007 y finalizaron en marzo de 2010.

En todo momento se contó con el consentimiento informado de los propietarios y/o responsables de todos los animales y se cumplieron los requisitos deontológicos y éticos para la realización del estudio, habiéndose obtenido el informe favorable del Comité de Experimentación Animal (CEA) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Entre los animales incluidos en el estudio, 13 pertenecían al animalario de la Facultad de Veterinaria de la UCM y 101 procedían de diferentes consultas del Hospital Clínico Veterinario Complutense (HCVC), a donde habían acudido para ser atendidos por diversos motivos médicos o quirúrgicos.

18 animales pertenecían a propietarios particulares que habían decidido participar en el estudio de forma voluntaria.

Otros 16 perros procedían de las siguientes clínicas veterinarias privadas colaboradoras: Clínica Veterinaria El Mundo Animal, de Villanueva de la Vera, Cáceres; Clínica Veterinaria Viñas Viejas, de Boadilla del Monte, Madrid; y Centro Médico Veterinario Los Álamos, de Torreldones, Madrid.

Asimismo, se contó con la participación de la Unidad de Guías Caninos de la Policía Nacional, que permitió la inclusión en este estudio de un total de 12 animales.

Por último, otros 7 perros procedían de las siguientes sociedades protectoras de animales de la Comunidad Autónoma de Madrid: Perrikus-Asociación en Defensa de los Animales Sierra Norte, Asociación Nacional de Amigos de los Animales (ANAA) y Asociación para la Liberación y Bienestar Animal (ALBA).

Cada uno de estos animales fue incluido en uno de los tres grupos establecidos en este trabajo: grupo de perros sanos, grupo de perros con EMC y grupo de perros atendidos

por diversas enfermedades diferentes a la EMC. Los criterios empleados en la clasificación de los animales en un grupo u otro se detallarán a continuación, en el apartado 4.3.4. de los Materiales y Métodos de la presente tesis doctoral.

4.3. PROTOCOLO DIAGNÓSTICO Y CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES

Con el fin de clasificar a los animales del estudio en los grupos mencionados, se llevó a cabo una anamnesis detallada a los propietarios o responsables de los animales y/o se consultaron sus historiales médicos.

Además se realizaron una exploración física completa y una toma de muestras sanguíneas para su posterior procesamiento para la realización de una analítica completa, IFI frente a *E. canis* y *L. infantum*, PCR frente a ambos agentes, citometría de flujo para la determinación del inmunofenotipo y, en el caso de los perros sanos y en aquellos con EMC a los que se administró doxiciclina, ELISAs comerciales para la determinación de la concentración en sangre de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α .

4.3.1. ANAMNESIS

En todos los animales se llevó a cabo una detallada recogida de datos y una completa anamnesis para obtener la máxima información acerca de los signos clínicos y tratamientos recibidos con anterioridad, para asegurar su correcta inclusión en los diferentes grupos.

Se prestó especial atención a los datos epidemiológicos o clínicos referentes a la raza del animal, su edad, el sexo, frecuencia de presentación de parásitos externos, aptitud y hábitat, motivo de consulta, sintomatología principal, diagnósticos previos de enfermedades infecciosas o parasitarias (especialmente ehrlichiosis o leishmaniosis), tratamientos recibidos (especialmente tratamientos con doxiciclina u otras tetraciclinas), etc.

4.3.2. EXPLORACIÓN FÍSICA

En todos los casos se llevó a cabo una exploración física completa, en la que se valoraron la coloración de las mucosas, el tiempo de relleno capilar y el grado de hidratación, se exploraron los nódulos linfáticos, se tomó la temperatura rectal y se realizaron una auscultación cardíaca y pulmonar y una palpación abdominal. En algunos casos fue necesaria la realización de otras exploraciones más específicas, como, por ejemplo, una exploración traumatológica o neurológica completas.

Asimismo, en algunos de los animales, principalmente en aquellos que fueron atendidos en el HCVC o en las clínicas veterinarias privadas colaboradoras por la presentación de sintomatología clínica diversa, fue necesario realizar pruebas complementarias, según necesidad, como radiografías, ecografías, análisis coprológicos, citologías, biopsias, etc., cuyos resultados fueron recogidos y condujeron al diagnóstico de patologías oncológicas, mucocutáneas, traumatológicas o digestivas.

4.3.3. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

De cada uno de los perros incluidos en el estudio se obtuvo una muestra sanguínea mediante punción de la vena cefálica o yugular. La sangre obtenida se recogió en tres tubos, dos con el anticoagulante EDTA (tetra-acetato de etilenediamida) y uno con heparina.

Una de las muestras en EDTA se empleaba para la realización de la incubación con los anticuerpos monoclonales conjugados con sondas fluorescentes para su posterior análisis en el citómetro de flujo. La otra muestra en EDTA se empleaba para la realización de una hematología y posterior extracción de ADN para pruebas moleculares.

La muestra sanguínea mantenida en tubos con heparina era centrifugada para la separación del plasma a 2500 rpm durante 20 minutos para la realización de la bioquímica sanguínea y las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a *E. canis* y *L. infantum*. Asimismo, esta muestra era empleada para la realización de los ELISAs para la determinación de la concentración plasmática de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10.

En el apartado número 4.5. del capítulo de materiales y métodos de esta tesis doctoral, se detallarán las técnicas utilizadas para la realización de este estudio a partir de las muestras sanguíneas obtenidas en cada control.

4.3.4. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES

De acuerdo con el plan de trabajo establecido al inicio de este estudio, los animales incluidos debían ser clasificados en tres grupos. Los criterios de inclusión empleados para cada uno de los citados grupos se describen a continuación:

➤ Grupo 1: perros sanos

Los criterios de inclusión de los animales en este grupo fueron:

- No presentar sintomatología clínica de enfermedad ni alteraciones en la exploración física.
- No observarse alteraciones en su analítica sanguínea.
- Presentar un resultado serológico negativo frente a *E. canis*, es decir, presentar títulos de anticuerpos determinados mediante IFI frente a este agente inferiores a 1:80, punto de corte empleado para el diagnóstico de esta enfermedad en nuestro laboratorio.
- No observarse amplificación de ADN de *Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia* spp. mediante PCR a partir de sus muestras sanguíneas.
- Presentar un resultado serológico negativo frente a *L. infantum* (títulos obtenidos mediante IFI inferiores a 1:100) y no mostrarse amplificación de ADN de este agente mediante PCR en sus muestras sanguíneas.
- No haber sido diagnosticados con anterioridad de EMC ni leishmaniosis canina ni haber padecido patologías importantes a lo largo de su vida.
- Asimismo, no debían haber recibido ningún tratamiento con tetraciclinas con anterioridad.

12 de los animales incluidos en el Grupo 1 de este estudio serían seleccionados para llevar a cabo el ensayo clínico de administración de doxiciclina, como se detallará posteriormente. En estos animales, tras la obtención del consentimiento informado de sus propietarios y/o responsables, debía asegurarse la administración del fármaco a la dosis y durante el tiempo que se describe en el apartado 4.4.1. y debía disponerse al final del estudio de todos los controles clínicos y laboratoriales descritos en el apartado 4.4.2. En los demás animales incluidos en este grupo sólo se realizó un único control clínico y laboratorial.

➤ Grupo 2: perros con EMC

Los criterios seguidos para la inclusión de los animales en el Grupo 2 fueron:

- Presentar un resultado serológico positivo mediante IFI frente a *E. canis* y/o mostrar amplificación de ADN de *E. canis* mediante PCR.
- Presentar un resultado serológico negativo frente a *L. infantum* (títulos obtenidos mediante IFI inferiores a 1:100) y no mostrar amplificación de ADN de este agente mediante PCR en sus muestras sanguíneas.
- No haber sido diagnosticados con anterioridad de EMC ni leishmaniosis canina.
- No haber recibido ningún tratamiento con tetraciclinas con anterioridad.

Por otra parte, entre los perros que cumplieron con los criterios de inclusión descritos para el Grupo 2 del estudio se trató de hacer una subclasificación en base a la fase de la enfermedad en la que se encontrasen. Debido a la dificultad existente en la infección natural por *E. canis* para diferenciar las tres fases típicamente descritas para la enfermedad (aguda, subclínica y crónica) (Woody & Hoskins 1991), se decidió diferenciar entre aquellos perros que se encontraban en la fase subclínica (es decir, eran asintomáticos) y los que se encontraban, por el contrario, en una fase clínica (sin diferenciar entre aguda o crónica).

Todos los animales con EMC incluidos en este estudio serían sometidos al tratamiento con doxiciclina recomendado por el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM) para hacer frente a la infección por *E. canis*. Sin embargo, se estableció que sólo aquellos perros con EMC tratados con doxiciclina de los que se pudo disponer al final del estudio de todos los controles clínicos y laboratoriales que se describen en el apartado 4.4.2. (días 0, 30, 90 y 180) serían incluidos en el ensayo clínico del efecto de la administración de este fármaco en el perro.

➤ Grupo 3: perros afectados por otras patologías

Este grupo está constituido por los perros atendidos por diversas enfermedades diferentes a la EMC y en todos ellos había sido necesaria la obtención de una muestra sanguínea, por diferentes motivos médicos o quirúrgicos. En todos los animales incluidos en este grupo sólo se llevó a cabo un único control clínico y laboratorial.

Los criterios que se siguieron para incluir a los animales en el Grupo 3 son:

- Presentar un resultado serológico mediante IFI negativo frente a *E. canis* y *L. infantum*.
- No observarse amplificación de ADN de *Ehrlichia* spp. ni de *Leishmania* spp. mediante PCR a partir de sus muestras sanguíneas.
- No haber sido diagnosticados con anterioridad de EMC ni leishmaniosis canina
- No haber recibido ningún tratamiento con tetraciclinas con anterioridad.
- Presentar sintomatología clínica y alteraciones laboratoriales compatibles con enfermedades que pudieran ser clasificadas en alguna de las siguientes categorías: mucocutáneas (cuando se trataba de enfermedades oftalmológicas, dermatológicas o de afectación de la cavidad oral), oncológicas, digestivas o traumatológicas.

4.4. ENSAYO CLÍNICO: ADMINISTRACIÓN DE DOXICICLINA

De acuerdo con el plan de trabajo de esta tesis doctoral, los animales con EMC fueron sometidos a un protocolo de tratamiento con doxiciclina y controlados de forma periódica para poder evaluar su respuesta y la evolución de los parámetros laboratoriales estudiados durante 6 meses. Del mismo modo, 12 de los perros del Grupo 1 de animales sanos recibieron doxiciclina a la misma dosis y durante el mismo tiempo que los perros con EMC y se realizó el mismo seguimiento, para poder disponer así de un grupo de perros control en el ensayo clínico y evaluar si la doxiciclina es capaz de ejercer efectos inmunomoduladores en la especie canina.

4.4.1. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO CON DOXICICLINA

Los perros que durante la realización de este estudio fueron diagnosticados de ehrlichiosis fueron tratados según el protocolo habitualmente recomendado por el Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis Canina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, que coincide con el protocolo de elección descrito por el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria para esta enfermedad: doxiciclina a dosis de 10 mg por kilogramo de

peso cada 24 horas, administrada durante 28 días. Así, se administró “Doxiciclina Normon 100 mg grageas” (Genéricos Normon, Madrid, España) o “Ronaxan[®] comprimidos” (Merial laboratorios, Barcelona, España), en función del peso del animal al inicio del tratamiento.

Además, debido a las características de esta tetraciclina, se recomendaba en todos los casos la administración del fármaco con alimento, para minimizar los efectos secundarios sobre el sistema gastrointestinal, evitando siempre la administración con productos lácteos.

El comienzo de la administración de doxiciclina a cada animal era considerado el punto de inicio del estudio en ese caso (o día 0).

El fármaco fue administrado siguiendo este mismo protocolo en el grupo control de perros sanos.

4.4.2. PLANIFICACIÓN DE LOS CONTROLES

Todos los animales incluidos en el ensayo clínico, es decir, los perros sanos a los que se les administró doxiciclina y los perros con EMC tratados con este fármaco, fueron sometidos a una serie de controles programados. En dichos controles, como se ha descrito previamente, se realizaba una anamnesis completa, una exploración física y una toma de muestras sanguíneas para la realización de una analítica sanguínea (con hematología, bioquímica y proteinograma), IFI frente a *Ehrlichia* spp. y *Leishmania* spp., PCR frente a ambos agentes, estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo y determinación mediante ELISA de la concentración plasmática de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10.

En concreto, en todos estos animales se llevaron a cabo 4 controles a lo largo del estudio:

- Día 0: se corresponde con el momento del inicio del tratamiento con doxiciclina. La toma de muestras sanguíneas se realizó en todos los casos antes de la administración del fármaco.
- Día 30: se trata del control realizado al finalizar el tratamiento con doxiciclina.
- Día 90: control llevado a cabo 3 meses después del inicio del tratamiento.
- Día 180: se trata del último control y se llevó a cabo transcurridos 6 meses del inicio del tratamiento con doxiciclina.

En este ensayo clínico del efecto de la administración de doxiciclina en la especie canina fueron excluidos todos aquellos perros del Grupo 2 (perros con EMC) de los que, a pesar de la planificación inicial de los controles descritos, no se pudo disponer de un seguimiento completo.

4.5. TÉCNICAS LABORATORIALES EMPLEADAS

A partir de las muestras sanguíneas recogidas de cada animal en los correspondientes controles, se realizaron una analítica completa, una IFI frente a *E. canis* y *L. infantum*, una PCR frente a ambos agentes, un estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo y una serie de ELISAs comerciales para la determinación de la concentración en sangre de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α .

A continuación se describirá la metodología empleada en el procesamiento de las muestras.

4.5.1. HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

En el estudio de las muestras sanguíneas de los perros del estudio, los parámetros que fueron evaluados son los siguientes:

- Parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), recuento de glóbulos blancos, fórmula leucocitaria y recuento plaquetar. En la realización de la hematología se ha empleado el citómetro de flujo ADVIA® 120 (Siemens Healthcare Diagnosis, Barcelona, España).
- Parámetros bioquímicos: medición de los valores plasmáticos de glucosa, urea, creatinina, proteínas totales y ALT. En la determinación de los valores de glucosa, urea, creatinina y ALT se emplearon técnicas enzimáticas colorimétricas (Bradford Diagnostics, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, y Thermo Scientific, Madrid, España) y, en el caso de las proteínas totales, se realizó una determinación colorimétrica basada en el principio de la

reacción de Biuret (Bradford Diagnostics, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Asimismo, se realizó un estudio de separación electroforética de las proteínas para la determinación del proteinograma, mediante el empleo de una técnica de electroforesis en gel de agarosa (Hydrasys®, Sebia Hispania S.A., París, Francia).

Los valores de referencia para la especie canina de la hematología, análisis bioquímico y proteinograma empleados en este estudio quedan reflejados en la Tabla 6.

Tabla 1: Valores hematológicos, bioquímicos y del proteinograma de referencia para la especie canina

Parámetros hematológicos	Valores de referencia para la especie canina
Hematocrito (%)	40,00-63,00
Hemoglobina (g/dl)	13,00-21,00
Glóbulos rojos x 10 ⁶ /μl	5,70-8,90
VCM (fl)	64,00-78,00
HCM (pg)	21,00-26,00
CHCM (g/dl)	30,00-36,00
Plaquetas x 10 ³ /μl	150,00-337,00
Leucocitos x 10 ³ /μl	4,60-17,40
Neutrófilos /μl (%)	3000-11500 (45,00-76,00)
Linfocitos /μl (%)	1000-4800 (16,00-45,00)
Monocitos /μl (%)	150-1350 (1,00-8,00)
Eosinófilos /μl (%)	100-1250 (1,00-10,00)
Basófilos /μl (%)	0-100 (0,00-2,00)
Parámetros bioquímicos	
Glucosa (mg/dl)	19,00-124,00
Urea (mg/dl)	8,00-33,00
Creatinina (mg/dl)	0,70-1,60
ALT (GPT) (U/l)	28,00-78,00
Proteinograma	
Proteínas totales (g/dl)	5,00-7,00
Albúmina g/dl (%)	2,3-3,4 (41,00-60,00)
Alfa 1 g/dl (%)	0,13-0,38 (2,5-5,50)
Alfa 2 g/dl (%)	0,62-1,60 (12,50-23,50)
Beta g/dl (%)	0,60-1,80 (12,00-26,00)
Gamma g/dl (%)	0,25-0,90 (5,00-13,00)
Ratio Albúmina/Globulinas (A/G)	0,7-1,5

4.5.2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

El plasma obtenido de las muestras de cada animal mediante centrifugación de la sangre con heparina fue empleado para la realización de un análisis serológico mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en el Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis Canina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Esta técnica tiene como finalidad la detección de la presencia de una respuesta inmunitaria humoral frente a un agente patógeno en concreto. Para lograr este objetivo debe detectarse la presencia de anticuerpos en el animal frente a dicho agente, buscándose en este caso la detección de anticuerpos frente a *E. canis* y/o *L. infantum*.

4.5.2.1. Antígenos empleados

Para la detección de anticuerpos frente a *E. canis* se empleó como antígeno el sobrenadante de la línea celular macrofágica canina DH82 (ATCC® number: CRL-10389) infectada con *E. canis* cepa Madrid, aislada por nuestro grupo de trabajo (número de acceso en GenBank: AY394465) (Imagen 1). El porcentaje de células infectadas en el cultivo era como mínimo de un 50% para su empleo en la técnica de IFI.

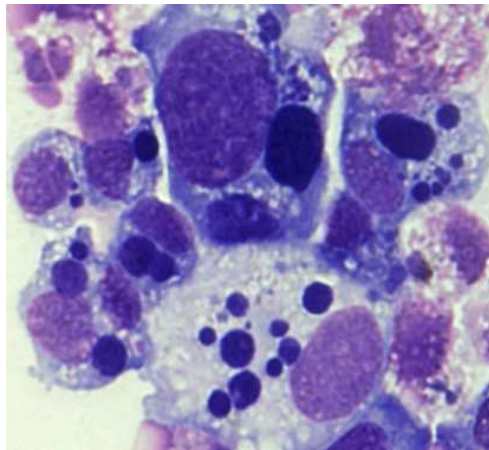


Imagen 1: Imagen de microscopio óptico de infección de la línea celular DH82 por *E. canis*, cepa Madrid, con tinción May-Grünwald-Giemsa (100X)

En el caso del diagnóstico serológico de *L. infantum*, el antígeno empleado procedía de un cultivo de promastigotes de *L. infantum* L-75 en medio NNN.

En ambos casos, el antígeno se obtuvo a partir del sobrenadante o fase líquida de los cultivos y se purificó mediante sucesivos lavados con PBS (*phosphate buffer solution*) y posterior centrifugación a 150 g durante 10 minutos a 22 °C. Tras el último lavado se resuspendió el precipitado en PBS para obtener una solución limpia. Tras comprobar la densidad celular en el microscopio, se colocaron 20 µl de antígeno en cada pocillo de los portas esmerilados especiales para inmunofluorescencia que constan de 18 pocillos de 4 mm de diámetro (Cell-line®, Cultek S.L.U., Madrid, España) (Imagen 2). Tras depositar el antígeno en los pocillos, se dejaron secar al aire y posteriormente se congelaron los portas a -20 °C hasta su empleo. En el momento de su uso se descongelaban previamente a temperatura ambiente durante unos 30-45 minutos.



Imagen 2: Portaobjetos para inmunofluorescencia indirecta

4.5.2.2. Técnica

El protocolo de la técnica de IFI empleada fue similar para ambos agentes, *E. canis* y *L. infantum*, sólo variando de una a otra el antígeno utilizado en la preparación de los portas, las diluciones seriadas de las muestras plasmáticas de los perros y los puntos de corte.

El protocolo de IFI que se sigue en nuestro laboratorio comprende los siguientes pasos:

- En primer lugar se realizan las diluciones seriadas en microplacas de las muestras plasmáticas problema en PBS a pH 7,2. Las diluciones empleadas inicialmente para la IFI frente a *E. canis* son de 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320, y frente a *L. infantum* son de 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400.
- A continuación, dichas diluciones se enfrentan con el antígeno que había sido depositado en los portas de la forma antes descrita y en cada porta se incluye, además, un control negativo y un control positivo previamente contrastados, procedentes de la seroteca del Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y

Leishmaniosis Canina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

- Posteriormente, se incuban los portaobjetos en estufa a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los portas se someten a tres lavados de 5 minutos en PBS a pH de 7,2 en agitación, permitiendo después su secado.
- Una vez secos los portas, se añaden a cada pocillo 20 µl de un anticuerpos secundario anti-IgG de perro obtenido en conejo que se encuentra conjugado con un compuesto fluorescente, el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Suffolk, Reino Unido) a una dilución de 1:100 en PBS a pH de 7,2. Se emplea como contraste azul de Evans a una concentración final de 1:1000.
- Los portas vuelven a incubarse durante 30 minutos en estufa a 37 °C para, una vez finalizada esta incubación, retirarse los restos de conjugado de cada pocillo y realizarse nuevamente tres lavados con PBS a pH de 7,2.
- Tras este último paso, se dejan secar los portas a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se montan los portas para su lectura, depositando unas gotas de glicerina tamponada comercial (Fluoprep®, Biomérieux, Madrid, España) y, sobre ellas, un cubreobjetos.
- La lectura de los portas se realiza empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus BH-2® (Olympus Imaging America Inc., Center Valley, Pennsylvania, Estados Unidos) con filtro azul, utilizando el objetivo de 40x aumentos (Imagen 3). Se comienza observando los pocillos con los controles para comprobar su positividad o negatividad y, a continuación, se leen las muestras problema. El título de anticuerpos es la máxima dilución a la que se detecta una fuerte fluorescencia.



Imagen 3: Microscopio de epifluorescencia

4.5.2.3. Puntos de corte

El punto de corte empleado en el Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis y Leishmaniosis Canina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid para considerar a un animal seropositivo frente a *E. canis* es de 1:80 (Aguirre et al. 2009).

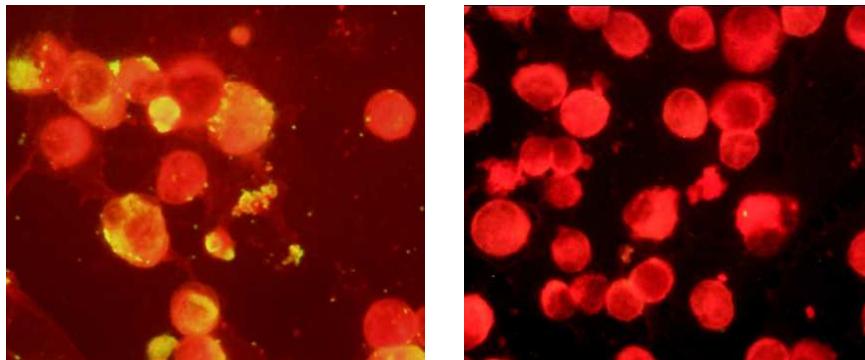


Imagen 4: Imágenes tomadas con el microscopio de epifluorescencia en las que se muestra un resultado positivo de la IFI frente a *E. canis* (imagen de la izquierda) y un resultado negativo frente a este mismo agente (imagen de la derecha).

En el caso de *L. infantum*, el punto de corte empleado es de 1:100 (Tesouro 1984).

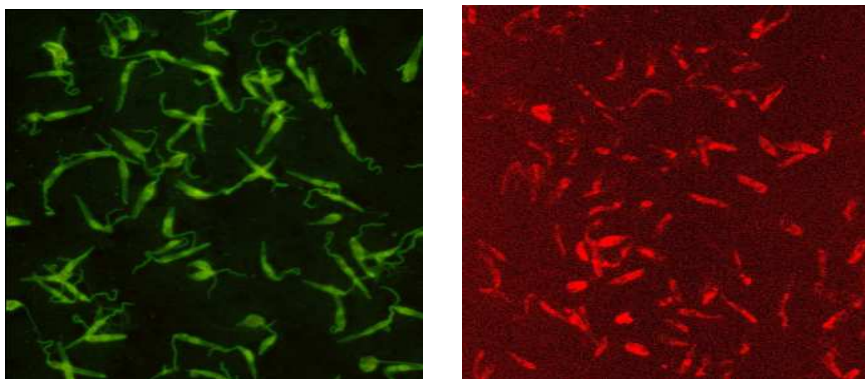


Imagen 5: Imágenes tomadas con el microscopio de epifluorescencia en las que se muestra un resultado positivo de la IFI frente a *L. infantum* (imagen de la izquierda) y un resultado negativo frente a este mismo agente (imagen de la derecha).

4.5.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En este estudio se ha buscado la amplificación de ciertas regiones del ADN de *E. canis* y/o de *L. infantum*.

Debido a la elevada sensibilidad de esta técnica, es importante emplear una serie de **medidas preventivas** de control del procedimiento completo, desde la extracción de ADN hasta la purificación del ADN amplificado, que eviten la contaminación de las muestras con ADN externo a ellas. Para ello, nos hemos ajustado en la medida de lo posible a las recomendaciones de varios autores (Kwok & Higuchi 1989, Newton 1995).

4.5.3.1. Extracción de ADN

Para llevar a cabo la extracción de ADN, se empleaban 200 µl de la muestra de sangre con el anticoagulante EDTA y el kit comercial “UltraClean™ DNA BloodSpin Kit” (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, California, Estados Unidos), según las indicaciones del fabricante. El ADN extraído se encontraba en un volumen final de 200 µl.

Como control positivo de la reacción se empleaba el ADN obtenido a partir del sobrenadante o fase líquida de los cultivos (de la línea celular DH82 infectada con *E. canis* y del cultivo de promastigotes de *L. infantum* en NNN). La extracción de dicho ADN se realizaba con el mismo kit descrito para las muestras sanguíneas y siguiendo el mismo protocolo.

Como control negativo de la reacción se empleaba agua estéril para inyectable (B. Braun Medical, S.A., Barcelona, España).

4.5.3.2. Control de la extracción de ADN

Una vez obtenido el ADN de cada una de las muestras de sangre de los perros, se hacía necesaria la comprobación de la correcta realización del procedimiento, lo que implicaría la presencia de ADN en las muestras obtenidas tras la extracción, así como la ausencia de inhibidores de la reacción de la PCR en ellas.

Como control de la reacción de extracción, se realizó una PCR con los cebadores que amplifican el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) (Barber et al. 2005, Birkenheuer et al. 2003), cuyo procedimiento se describirá más adelante en este apartado de materiales y métodos. Este gen pertenece a los genes denominados genes de mantenimiento celular o *housekeeping*, que codifican proteínas que son esenciales para la fisiología y funcionamiento celular.

4.5.3.3. Cuantificación y valoración de la calidad del ADN

Una vez determinada la presencia de ADN en las muestras y la ausencia de inhibidores de la PCR, se realizó la cuantificación de la concentración de ADN de cada una en la Unidad de Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Para ello se empleó la tecnología NanoDrop™ (Thermo Scientific, Delaware, Estados Unidos), mediante la medida de la absorbancia de la luz ultravioleta a las longitudes de onda 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm nos indica la concentración de ADN de la muestra, siendo la concentración idónea para la realización posterior de la PCR de 10-40 ng/μl. La relación entre las lecturas a 260 y a 280 nm (relación ADN/proteínas), permite estimar la pureza del ADN y excluir la existencia de contaminación proteica de la muestra. Para poder considerar que la muestra de ácido nucleico es óptima para su empleo en la PCR, la relación 260/280 debe encontrarse entre 1,6 y 2.

4.5.3.4. Procesamiento de las muestras mediante PCR

Cada muestra de ADN, tras la comprobación de que contaba con una calidad óptima, era sometida a un análisis mediante PCR para la detección de ADN de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. y *Leishmania* spp. En la PCR empleada como control de la extracción de ADN se emplearon los cebadores específicos para el gen GAPDH, esperándose en todos los casos un resultado positivo o de amplificación, lo que indicaría la existencia de ADN amplificable y la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR. Los cebadores empleados en esta reacción fueron el GAPDH-1 (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT) y el GAPDH-2 (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC) (Birkenheuer et al. 2003), que fueron preparados previamente a una concentración de 30 μM, siendo la concentración en la solución final de 0,6 μM, al añadirse de cada uno de ellos 0,3 μl en un volumen final de reacción de 15 μl. En esta reacción se emplearon como premezcla 4 μl de agua, 7,5 μl de Premix Taq®

(Takara Ex Taq TM Version, compuesta por la enzima Takara a 1,25 U/25µl, una mezcla de dNTPs a concentración 2X, 0,4mM, y buffer de reacción concentrado a 2X, que incluye 4mM de Magnesio), 0,3 µl de cada cebador y 0,3 µl de ADN. El protocolo empleado en la realización de la PCR de *housekeeping* fue de 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto, seguido de 45 ciclos consistentes en 4 segundos a 94°C, 4 segundos a 57°C y 3 segundos a 72°C, para finalizar con 1 ciclo de 1 minuto de duración a 72°C.

En el caso de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Neorickettsia* spp. se realizó una única PCR convencional que emplea unos cebadores capaces de amplificar todas estas especies de la familia Anaplasmataceae. Estos cebadores son el GEP-s (5'-CTGGCGGCAAGCYTAACACATGCAAGTCGAACGGA) y el GEP-as (5'-CTTCTRTRGGTACCGTCATTATCTTCCCYAYTG), que tienen como diana la porción 16S del ARN ribosómico (Eddlestone et al. 2007). La premezcla de reactivos empleados en esta reacción contenía 7,5 µl de agua, 12,5 µl de la Premix Taq®, 0,25 µl de cada cebador y 5 µl de ADN, obteniéndose un volumen final de 25 µl. Los cebadores se preparaban a una concentración de 50 µM, con lo que su concentración en la solución final era de 0,5 µM. El protocolo que se empleó en esta reacción consistió en 1 ciclo de 2 minutos de duración a 95°C, seguido de 55 ciclos consistentes en 10 segundos a 94°C, 10 segundos a 66°C y 10 segundos a 72°C, para finalizar con 1 ciclo de 1 minuto de duración a 72°C.

En aquellos casos en los que se produjese amplificación en la reacción anterior, se realizaba una nueva PCR a nivel de especie, con el fin de detectar en este caso ADN de *E. canis*, mediante el empleo de unos cebadores más específicos. Estos cebadores son: *E. canis*-s (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA) y SEP-as (5'-CTTCTRTRGGTACCGTCATTATCTTCCCY), que tienen como diana la porción 16S del ARN ribosómico (Beall et al. 2008). En este caso, se empleó como premezcla de los reactivos 7 µl de agua, 12,5 µl de Premix Taq®, 0,50 µl de cada cebador (concentración en la solución final de 1µM) y 5 µl de ADN para llevar a cabo un protocolo consistente en 1 ciclo inicial a 95°C durante 2 minutos, seguido de 55 ciclos de 10 segundos a 94°C, 10 segundos a 58°C y 10 segundos a 72°C, para finalizar con un ciclo de 1 minuto de duración a 72°C.

Para la amplificación de ADN de *Leishmania* spp. se realizó también una PCR convencional empleando unos cebadores capaces de amplificar una porción del ADN del kinetoplasto de *L. infantum* (Lachaud et al. 2002). Estos cebadores son LSH-1 (5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG) y LSH-2 (5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA), que corresponden a los denominados por otros autores como RV1 y RV2, respectivamente

(Lachaud et al. 2002). A partir de los protocolos empleados por Lachaud y colaboradores y Fichoux y colaboradores (le Fichoux et al. 1999, Lachaud et al. 2002) se realizaron cambios en distintas variables, como son la concentración de cebadores a emplear, la cantidad de Taq a incluir en la premezcla, la concentración de los dNTP's y la temperatura de anillamiento, para determinar finalmente que la reacción era más específica empleando 31,8 μ l de agua, 5 μ l de buffers de reacción, 1 μ l de dNTP's a concentración de 200 μ M, 0,5 μ l de cada cebador a una concentración de 1 μ M, 1,2 μ l de Taq y 10 μ l de ADN. El protocolo seguido en esta reacción consistió en 1 ciclo inicial de 4 minutos de duración a 94°C de temperatura, seguido por 55 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C y 30 segundos a 72°C, para finalizar con un ciclo de 10 minutos de duración a 72°C.

En todos los casos se emplearon en estas reacciones los termocicladores MasterCycler® Personal y/o el MasterCycler® ep Gradient (Eppendorf, Alemania) (Imagen 6).

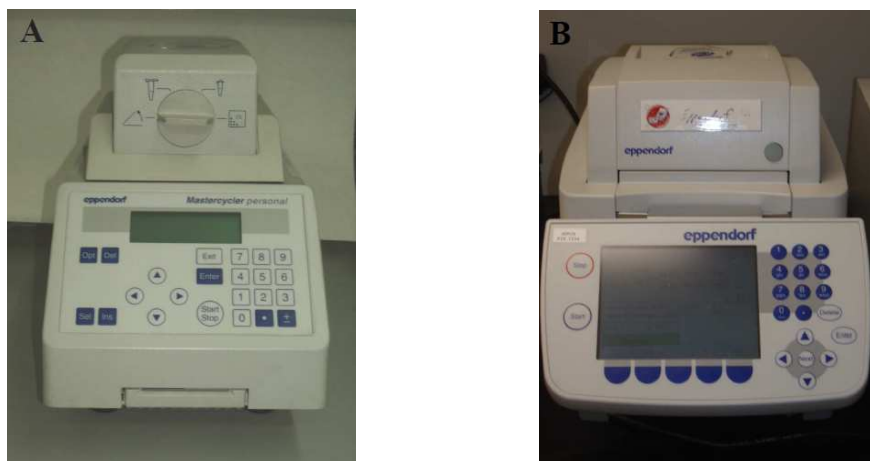


Imagen 6: Termocicladores empleados en la realización de las PCRs. **A:** Termociclador MasterCycler® Personal. **B:** Termociclador MasterCycler® ep Gradient

Para la lectura de los resultados, el producto de la reacción de cada PCR se mezclaba con un tampón de carga compuesto por azul de bromofenol al 5%, xilencyanol al 0,25% y glicerol al 30%, para añadirse a continuación la mezcla resultante a un pocillo del gel de electroforesis consistente en 100 ml de TAE 1X (Trizma® Base, de Sigma®, España, Ácido Acético Glacial purísimo, de Panreac Química, S.A., España, y EDTA a 0,5 M y pH 8), con agarosa (Laboratorios Conda, España) y 2 μ l de Bromuro de Etidio (Fisher Biotech, Wembley, Australia). La cantidad de agarosa empleada varió entre 1,5 y 2 g según el tamaño de fragmento de ADN esperado en cada reacción. Para poder determinar el tamaño de la banda amplificada en cada caso se empleó un marcador de 100 pares de bases (Fermentas, Inc, Glen Burnie, Maryland, Estados Unidos) y la lectura del gel se

realizó mediante la visualización en el transiluminador de luz ultravioleta de Vilber Lourmat (Francia).

En los casos en los que se obtenía amplificación tras la realización de la PCR correspondiente se procedía a la purificación del ADN empleando el kit “BioClean Columns” (Biotools Labs, S.A., Madrid, España) para su posterior secuenciación en Secugen (campus del CSIC de la Ciudad Universitaria de Madrid) utilizando el secuenciador de ADN automático ABI3100, BigDye® Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc, Foster City, California, Estados Unidos).

4.5.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

Los estudios de citometría de flujo se llevaron a cabo a partir de las muestras sanguíneas de cada perro recogidas en tubos con el anticoagulante EDTA. El procesado de las muestras fue llevado a cabo en todos los casos en los que fue posible en las primeras 2 horas tras su extracción. En algunos casos en los que no pudo ser realizado el marcaje de los linfocitos con los anticuerpos monoclonales en el período de tiempo descrito, las muestras fueron mantenidas en refrigeración hasta su procesado, siempre dentro de un período máximo de 12 horas tras su recogida, siguiendo las indicaciones de Faldyna y colaboradores (Faldyna et al. 2001) y la experiencia previa de nuestro grupo de investigación en este tipo de procesamiento (datos sin publicar).

El análisis posterior de las muestras en el citómetro de flujo fue realizado en el Centro de Ayuda a la Investigación de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la Universidad Complutense de Madrid, empleando para ello un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton-Dickinson, San José, CA).

4.5.4.1. Anticuerpos monoclonales empleados

Los anticuerpos monoclonales empleados en la realización de este estudio fueron suministrados por “AbD Serotec” (Oxford, Reino Unido). Debido a la necesidad de enfrentar varios de estos anticuerpos para poder determinar las poblaciones linfocitarias que se describirán más adelante en esta tesis, fue necesario emplear diferentes fluorocromos (en concreto FITC, PE y Alexa Fluor® 647) que se conjugaron con los

diferentes anticuerpos. Era necesario que los anticuerpos monoclonales que fuesen a emplearse de forma conjunta en el marcaje de alguno de los tubos con la muestra problema estuviesen conjugados con fluorocromos diferentes, cuyas fluorescencias no interfiriesen entre sí, permitiendo su diferenciación en la lectura del citómetro.

Los anticuerpos monoclonales utilizados, así como los fluorocromos con los que se conjugaron y el fenotipo de los linfocitos que identifican, se han reflejado en la Tabla 2.

Tabla 2: Anticuerpos monoclonales empleados en el estudio de citometría de flujo

Especificidad	Descripción	Anticuerpo (clon)	Fenotipo linfocitario reconocido	Conjugado con el fluorocromo
CD3	IgG1 de ratón anti CD3 canino	CA17.2A12	Linfocitos T	FITC
CD4	IgG2a de rata anti CD4 canino	YKIX302.9	Linfocitos Th	PE
CD8	IgG1 de rata anti CD8 canino	YCATE55.9	Linfocitos Tc	Alexa Fluor® 647
CD21	IgG1 de ratón anti CD21 canino	CA2.1D6	Linfocitos B	PE
CMH clase II	IgG2a de rata anti CMH de clase II canino	YKIX334.2	Expresión de CMHII en superficie	FITC

4.5.4.2. Procesado de las muestras

Mediante el empleo de la citometría de flujo en el inmunofenotipaje se han enfrentado la población de células problema, cuyas características se desconocían para cada caso, y una combinación de anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos. En concreto, en la realización de este estudio, cada muestra fue expuesta a cuatro combinaciones de diferentes anticuerpos monoclonales, con el objetivo de poder determinar las subpoblaciones linfocitarias T, Th y Tc, y B, así como valorar la expresión de las moléculas del CMH de clase II en su superficie.

Tras la contrastación de la metodología descrita por el fabricante de los anticuerpos monoclonales mediante la realización de numerosas pruebas por nuestro equipo de trabajo y la adaptación de la técnica según las necesidades y condiciones de nuestro laboratorio, se determinaron las condiciones en las que se obtenían los mejores resultados en el inmunofenotipaje a partir de sangre canina.

El protocolo empleado en este estudio en el marcaje linfocitario consistió en:

- Para cada muestra sanguínea se empleaban cuatro tubos de citometría de flujo, en cada uno de los cuales eran añadidos 100 μ l de sangre.
- A continuación se añadían los anticuerpos monoclonales de forma que en el tubo 1 se enfrentasen las células con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8; en el tubo 2 se añadía en un principio solamente el anticuerpo anti-CD3, aunque en un paso posterior se añadía también el anti-CD21, para evitar problemas de inespecificidad descritos por el fabricante al enfrentar los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD21 de forma simultánea; en el tubo 3 se enfrentaban las células con los anticuerpos anti-CMHII y anti-CD21; y en el tubo 4 las células no eran enfrentadas con ningún anticuerpo, a modo de control. En la Tabla 3 queda reflejado el panel de anticuerpos que se añadían a cada tubo a lo largo del protocolo. Tras la incorporación de los anticuerpos, se procedía a una incubación a oscuras de 30 minutos de duración.

Tabla 3: Panel de anticuerpos empleados en el estudio en cada tubo de citometría de flujo

Nº de tubo	Anticuerpos añadidos en la primera incubación	Anticuerpos añadidos en la segunda incubación	Moléculas de superficie detectadas en el tubo
1	3 μ l de anti-CD3, 5 μ l de anti-CD4 y 5 μ l de anti-CD8	—	CD3, CD4 y CD8
2	3 μ l de anti-CD3	2 μ l de anti-CD21	CD3 y CD21
3	5 μ l de anti-CMHII y 2 μ l de anti-CD21	—	CMHII y CD21
4	—	—	—

- En los tubos 1, 3 y 4, una vez finalizada la primera incubación, se añadía una solución de eritrolisis (*Erythrolyse red blood cell lysing buffer*, de AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) para permitir el análisis posterior únicamente de leucocitos. Se dejaba actuar a este buffer de lisis eritrocitaria durante 10 minutos para, a continuación, centrifugar a 400g durante 5 minutos y realizar un lavado con una solución de PBS con un 1% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) y un 0,36% de glucosa (PBS/BSA).
- En el tubo 2, una vez transcurrido el tiempo de la primera incubación de los anticuerpos monoclonales, se realizaba un lavado con la solución de PBS/BSA, seguido de una centrifugación a 400g durante 5 minutos. El sobrenadante, en el que estaría incluido el anticuerpo anti-CD3 que no se hubiese unido a las células, era eliminado y las células decantadas eran resuspendidas en 100 µl de la solución de PBS/BSA, para añadirles a continuación el anticuerpo anti-CD21 y comenzar la segunda incubación de 30 minutos de duración.
- Finalizada la segunda incubación del tubo 2, se procedía a realizar la eritrolisis y lavado posterior de la muestra de la misma forma recientemente descrita que para los tubos 1,3 y 4.
- Finalmente, se añadía a cada uno de los tubos (1, 2, 3 y 4) 100 µl de un fijador celular especial para citometría de flujo (BD CellFix™, de Becton Dickinson, Bélgica), para su posterior análisis en el Centro de Ayuda a la Investigación de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la Universidad Complutense de Madrid.

4.5.4.3. Análisis de los datos e inmunofenotipaje

Una vez procesadas las muestras, el análisis de las poblaciones leucocitarias era realizado mediante el empleo de un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San José, CA), que cuenta con dos fuentes de excitación: un láser de argón de 15 mW que emite a 488nm y un diodo láser rojo que emite a 635 nm.

Los parámetros analizados para cada célula fueron:

- Dispersión frontal de luz (FSC): como se ha descrito en la revisión bibliográfica, este parámetro puede considerarse proporcional al tamaño de la célula o partícula analizada.
- Dispersión lateral de luz (SSC): nos da una idea de la granularidad o complejidad de la partícula analizada.
- Fluorescencia verde (log FL1): en este estudio, la cantidad de fluorescencia verde emitida por las células estará directamente relacionada con la cantidad de anticuerpos monoclonales conjugados con FITC que se hayan unido a ella (anti-CD3 o anti-CMHII). Así, por ejemplo, si una célula del tubo 1 es un linfocito T, se unirán a sus moléculas de superficie CD3 (que forman parte del complejo del receptor de las células T) los anticuerpos monoclonales anti-CD3, que se encuentran conjugados con FITC, de forma que, al incidir sobre ella el haz de luz láser a 488nm, se excitará este fluorocromo y el citómetro detectará la fluorescencia resultante, de color verde, en el detector FL1, que recoge la emisión de fluorescencia a 530/30 nm.
- Fluorescencia amarilla-anaranjada (log FL2): en este estudio, la cantidad de fluorescencia naranja emitida por las células será proporcional a la cantidad de anticuerpos conjugados con PE que se hayan unido a su superficie (anti-CD4 y anti-CD21). El detector FL2 recoge la emisión de fluorescencia a 582/42 nm.
- Fluorescencia rojo lejano (Log FL4): en este estudio, la cantidad de fluorescencia de color rojo lejano emitida por las células será proporcional a la cantidad de anticuerpos conjugados con Alexa Fluor[®] 647 que se hayan unido a su superficie (anti-CD8) y será recogida por el detector FL4, a 661/16 nm.

Los parámetros fueron adquiridos en forma de histogramas mono y biparamétricos y en modo lista. Mediante el empleo de diferentes programas informáticos (como el CellQuest®, el WinMDI versión 2.8 o el Summit® version 3.1) fue posible analizar posteriormente los resultados de cada uno de los tubos procesados.

En el estudio de nuestros resultados se realizaba en primer lugar una clasificación de las células en función de sus características de dispersión de la luz (SSC y FSC). En el histograma biparamétrico de la Imagen 7 puede observarse la distribución de los leucocitos en función de sus características de dispersión de la luz:

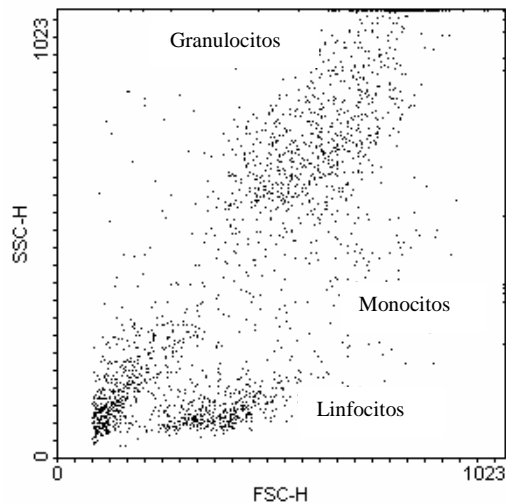


Imagen 7: Propiedades de dispersión de la luz de las células analizadas mediante citometría de flujo a partir de sangre periférica canina.

A partir de estas representaciones era posible delimitar o acotar la región de los linfocitos (Imagen 8).

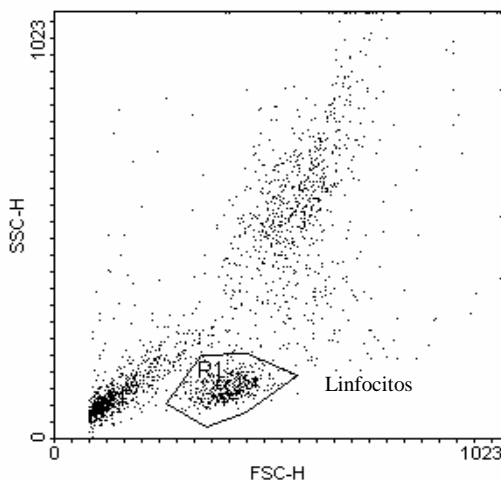


Imagen 8: Acotamiento o delimitación de la región de los linfocitos en base a sus propiedades de dispersión de la luz en un análisis de citometría de flujo de sangre canina

A partir de los eventos acotados en esa región o ventana se realizaban a continuación las evaluaciones de los parámetros de fluorescencia. En las siguientes figuras

(Imagen 9) se muestra un ejemplo de análisis mediante citometría de flujo del tubo número 1 de uno de los perros incluidos en el estudio:

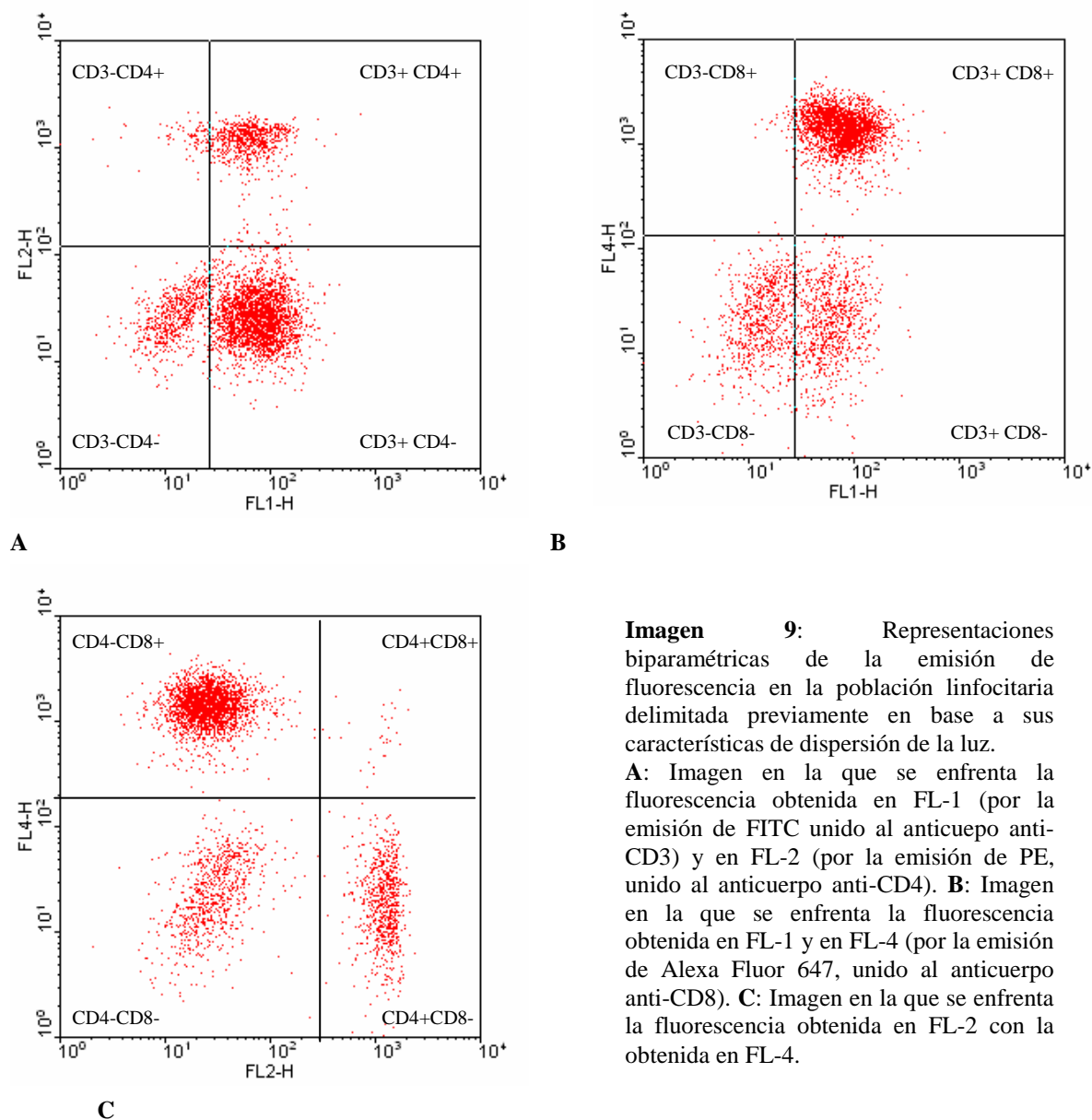


Imagen 9: Representaciones biparamétricas de la emisión de fluorescencia en la población linfocitaria delimitada previamente en base a sus características de dispersión de la luz.

A: Imagen en la que se enfrenta la fluorescencia obtenida en FL-1 (por la emisión de FITC unido al anticuerpo anti-CD3) y en FL-2 (por la emisión de PE, unido al anticuerpo anti-CD4). **B:** Imagen en la que se enfrenta la fluorescencia obtenida en FL-1 y en FL-4 (por la emisión de Alexa Fluor 647, unido al anticuerpo anti-CD8). **C:** Imagen en la que se enfrenta la fluorescencia obtenida en FL-2 con la obtenida en FL-4.

Gracias a los anticuerpos monoclonales empleados en este estudio hemos podido evaluar las poblaciones linfocitarias caninas que se describen a continuación:

- Los linfocitos T están representados por aquellas células presentes en la región de los linfocitos (por sus características de tamaño y complejidad celular), a los que se unen los anticuerpos monoclonales anti-CD3. Por tanto, el porcentaje de esta población se puede calcular mediante la suma de los linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD4- o por la suma de CD3+CD8+ y CD3+CD8-, en el tubo 1, o bien mediante el cálculo del porcentaje de los linfocitos CD3+CD21- del tubo 2. En

nuestro estudio, el cálculo del porcentaje de linfocitos T CD3+ se ha realizado hallando la media entre estos valores. Dentro de la población de linfocitos T, hemos podido evaluar las siguientes subpoblaciones:

- Los linfocitos Th son aquellos que resultan marcados como CD3+CD4+.
 - Los linfocitos Tc están representados por los CD3+CD8+.
- Los linfocitos B están representados por las células marcadas como CD21. En concreto, en nuestro estudio se ha calculado el porcentaje de linfocitos B presentes en cada muestra hallando la media entre el valor de linfocitos CD3-CD21+ obtenidos en el tubo 2 y el valor de los linfocitos marcados con CD21 en el tubo 3.
- Los linfocitos no T y no B serían las células NK, según la definición (Glimcher et al. 1977, Abbas et al. 2008g, Tizard 2009s), por lo que en principio deberían ser considerados los linfocitos CD3-CD21-. Sin embargo, al no haber empleado en este estudio un marcador general de linfocitos, no podemos asegurar que en esa población de linfocitos doble negativos no exista algún resto celular de pequeño tamaño (como restos de eritrocitos que no hayan sido totalmente eliminados con los lavados con PBS/BSA), lo que debe ser tenido en cuenta en la interpretación de los resultados.
- Los linfocitos marcados con CMHII no corresponden a ninguna población en concreto de linfocitos en el caso de la especie canina, siendo expresada esta molécula en la práctica totalidad de las células mononucleares (Byrne et al. 2000).

Una vez calculado el porcentaje de cada una de las poblaciones linfocitarias de interés, se calculó el valor absoluto de dichas poblaciones en relación al número total de linfocitos presentes en cada mililitro de la muestra.

Por tanto, al finalizar el estudio inmunofenotípico de cada muestra sanguínea se disponía de información referente a los números absolutos y los números relativos expresados en porcentaje de linfocitos de las siguientes subpoblaciones linfocitarias: linfocitos T, linfocitos Th y Tc, linfocitos B y linfocitos que expresan CMHII.

4.5.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CITOCINAS MEDIANTE ELISA

A partir de las muestras de plasma de los animales de los Grupos 1 y 2 que fueron incluidos en el ensayo clínico de administración de doxiciclina, se llevó a cabo la determinación de los niveles de cuatro citocinas en sangre: IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α .

4.5.5.1. Protocolo de procesado de las muestras

En este estudio se ha empleado el ELISA como método de detección de las citocinas características de las respuestas de tipo 1 IFN- γ y TNF- α , y las citocinas de las respuestas de tipo 2 IL-6 e IL-10. En la revisión bibliográfica de la presente tesis doctoral ya se han descrito las funciones de cada una de estas citocinas.

En concreto, se han utilizado kits comerciales de R&D Systems (Minneapolis, Estados Unidos) consistentes en técnicas ELISA en sandwich cuantitativas, que cuentan con una placa de 96 pocillos en los que se encuentran unidos anticuerpos específicos frente a la citocina canina de interés en cada caso. Una vez añadidas las muestras de plasma, la cantidad de la citocina que está siendo evaluada en la muestra del perro quedará ligada a los anticuerpos unidos a la placa. Tras un lavado que permite eliminar todas aquellas sustancias que no se hayan unido al anticuerpo, se añadirá un nuevo anticuerpo específico de la citocina que se encuentra unido a una enzima (o al que se unirá una enzima en un paso posterior, dependiendo del kit empleado). Se realiza de nuevo un lavado para eliminar los anticuerpos no unidos y, posteriormente, se añade un sustrato que inicia la reacción enzimática. Esta reacción da lugar a la generación de una sustancia coloreada. La intensidad del color generado en cada muestra es proporcional a la cantidad de citocina canina ligada en el paso inicial del ELISA y dicha intensidad de color es medida mediante espectrofotometría, como se verá a continuación.

En el estudio inmunoenzimático de la concentración de IFN- γ se ha empleado el kit comercial “Quantikine® Canine IFN- γ Immunoassay” (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos). La técnica y el protocolo empleados son los recomendados por el fabricante. Cada una de las muestras fue analizada por duplicado y se empleó como control positivo una solución de IFN- γ recombinante canino con una concentración de 322-537 pg/ml que fue suministrada por el fabricante y que también fue añadida a la placa del kit por duplicado (“Canine IFN- γ Control”, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos). Con la finalidad de poder extrapolar los datos de la concentración de IFN- γ de cada muestra a partir de los datos obtenidos de la absorbancia, se realizó para cada una de

las placas de 96 pocillos una curva patrón a partir de una solución de 4000 pg/ml de concentración de la citocina, empleando para la realización de la curva las diluciones de 4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml y una última solución standard de 0 pg/ml de concentración. En esta curva se han empleado los reactivos suministrados por el fabricante “Canine IFN- γ Standard” y el “Calibrator Diluent RD6-12” (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos).



Imagen 10: Fotografía de los pocillos que contienen diferentes concentraciones conocidas de IFN- γ para la realización de la curva patrón de esta citocina.

Para el cálculo de la concentración de la IL-6 se utilizó el kit “Quantikine ® Canine IL-6 Immunoassay” (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos). Cada muestra fue analizada por duplicado y se empleó el control positivo suministrado por el fabricante (“Canine IL-6 Control”, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos), a una concentración de 206-343 pg/ml. La curva patrón se elaboró con las absorbancias detectadas para las soluciones de IL-6 a concentración de 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml y 0 pg/ml, a partir de los productos “Canine IL-6 Standard” y “Calibrator Diluent RD5T” (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos).

La concentración de IL-10 para cada muestra fue determinada utilizando el kit de ELISA comercial “Quantikine ® Canine IL-10 Immunoassay” (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos). En este caso se realizó una modificación respecto a las indicaciones del fabricante, ya que en el protocolo del kit comercial se indica la necesidad de diluir las muestras de plasma canino a la mitad de su concentración inicial. Sin embargo, al evaluar muestras plasmáticas de perros en nuestro laboratorio se detectaron concentraciones de esta citocina más bajas de lo esperado, por lo que las muestras de plasma de los perros sanos y de los perros con EMC de nuestro estudio no fueron diluidas. Los demás pasos del protocolo fueron llevados a cabo según las indicaciones del fabricante. Cada muestra fue analizada por duplicado y se empleó como solución control el “Canine IL-10 Control” (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos), de 127-212 pg/ml de concentración. La curva patrón se realizó a partir de los datos de absorbancia obtenidos de las diluciones de la solución “Canine IL-10 Standard” con el diluyente “Calibrator Diluent RD6-12”, ambos de R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos,

empleándose las concentraciones 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml y 0 pg/ml.

En el caso de la lectura de la concentración de TNF- α a partir de las muestras de plasma de los perros de los Grupos 1 y 2 que fueron incluidos en el ensayo clínico de administración de doxiciclina, se empleó el kit comercial “Quantikine $\text{\textcircled{R}}$ Canine TNF- α Immunoassay” (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos). Al igual que en los casos anteriores, se analizó cada muestra problema por duplicado y se empleó un control positivo evaluado también por duplicado. En este caso el control positivo era una solución de TNF- α recombinante canino a una concentración de 43-75 pg/ml (“Canine TNF- α Control”, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos). La curva patrón se realizó a partir de los reactivos suministrados por el fabricante (“Canine TNF- α Standard” y “Calibrator Diluent RD5-17”, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Estados Unidos), empleando las diluciones de 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml y 0 pg/ml.

4.5.5.2. Lectura de la absorbancia

Una vez llevado a cabo el procesado de las muestras, se realizaba la lectura de la densidad óptica o absorbancia de cada una, siempre en un tiempo máximo de 30 minutos una vez finalizado el protocolo de procesado, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La lectura de las absorbancias se realizaba a 450 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan $\text{\textcircled{R}}$ FC (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia) (Imagen 11). Con el objetivo de asegurar unas lecturas lo más exactas posibles, a las medidas de la absorbancia a 450 nm se sustraía el resultado de las absorbancias a 540 nm.

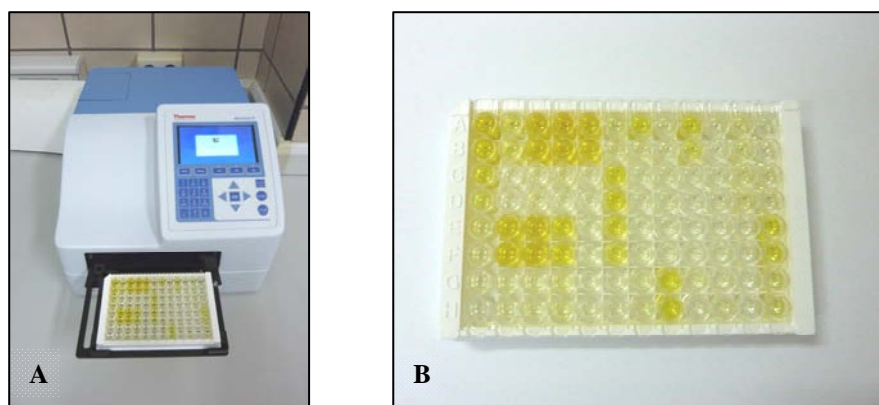


Imagen 11: A: Espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan $\text{\textcircled{R}}$ FC. B: Placa comercial de ELISA empleada en este estudio

4.5.5.3. Cálculo de la concentración de las citocinas para cada muestra

Con la finalidad de calcular la concentración de cada una de las citocinas presentes en las muestras de los perros sanos y de los perros con EMC incluidos en el ensayo clínico de administración de doxiciclina, una vez determinada la diferencia de la absorbancia a 450 y a 540 nm de longitud de onda, se calculó la media de las lecturas de absorbancia de cada muestra (a partir de los resultados obtenidos por duplicado para cada una, como se describió previamente).

A partir de las medidas de absorbancia de las diluciones empleadas para la realización de la curva patrón, pudieron crearse las curvas correspondientes para cada citocina, obteniéndose en todos los casos un coeficiente de regresión superior a 0,99. Las medias de la absorbancia de cada muestra se pudieron relacionar con un valor de concentración de la citocina evaluada en cada caso a partir de la curva patrón correspondiente. Para llevar a cabo estas curvas patrón, así como para la posterior extrapolación de las concentraciones de cada citocina para cada muestra, se empleó el programa informático Thermo Scientific SkanIt® Software, versión 2.5 (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia).

4.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los resultados obtenidos en este trabajo fueron analizados estadísticamente por el Departamento de Apoyo a la Investigación del Área de Informática y Comunicaciones de la Universidad Complutense de Madrid, empleando para ello el programa informático SPSS 17.0 para Windows (SPSS, 2007).

Por una parte, se ha realizado una estadística descriptiva de todos los resultados obtenidos. Dicha estadística descriptiva nos ha permitido, entre otras cosas, determinar las características de nuestra población de estudio y establecer unos valores de referencia para las diferentes variables cuantitativas analizadas, entre las que cabe destacar aquellas que nos han permitido caracterizar el inmunofenotipo en los perros sanos. Por otra parte, se ha realizado una estadística analítica que nos ha permitido evaluar la posible existencia de asociaciones estadísticamente significativas entre diferentes características de la población en estudio y las variables analizadas, así como evaluar la evolución de dichas variables en

el tiempo tras el tratamiento con doxiciclina tanto en los perros sanos como en los perros con EMC incluidos en el ensayo clínico.

En función de los objetivos concretos en cada caso y de las características de las variables analizadas, se han empleado diferentes métodos estadísticos, que serán descritos a continuación:

- Estadística descriptiva de las variables cuantitativas (mediante el procedimiento DESCRIPTIVE). Este análisis ha permitido hacer una descripción de las “muestras” en cuanto a su media, desviación estándar, valor máximo, valor mínimo, mediana, desviación estándar de la media, etc. (Ferrán Aranaz 1996).
- Estadística descriptiva de las variables cualitativas (procedimiento FRECUENCIAS), con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías establecidas para cada variable cualitativa (Ferrán Aranaz 1996).
- Test de Kolmogorov-Smirnov para una muestra (procedimiento NPAR TESTS): permite determinar si las variables cuantitativas del estudio provienen de una distribución normal (Ferrán Aranaz 1996).
- Tablas de contingencia para evaluar la relación entre variables cualitativas (procedimiento CROSSTABS): con la finalidad de contrastar la independencia o influencia entre dos variables cualitativas se empleó el test de la chi cuadrado de Pearson (χ^2) (Everitt 1992, Ferrán Aranaz 1996).
- Análisis de la varianza (ANOVA), procedimiento ONEWAY, para la comparación de múltiples medias. Cuando el valor global de la F de Snedecor es significativo nos indica que las medias en los grupos no son iguales. Se ha empleado, además, el test de Bonferroni, que realiza comparaciones de múltiples medias, ordenando las medias de menor a mayor y compara las diferencias entre pares (menor-mayor), conectando los grupos que no difieren significativamente. De esta manera, halla subconjuntos de medias no significativamente diferentes: si dos medias se agrupan en un mismo subconjunto no son diferentes significativamente. En caso contrario, serán diferentes significativamente (Ferrán Aranaz 1996, Sánchez et al. 1996).
- Test de la *t* de Student (procedimiento T-TEST): se ha empleado para la comparación de dos medias en las variables cuantitativas, asumiendo o no igualdad de varianzas (método paramétrico). La igualdad de varianzas se contrasta con el test de Levene (lo que nos indicará si es más adecuado el test asumiendo varianzas iguales o desiguales) (Ferrán Aranaz 1996).
- Análisis de medidas repetidas (procedimiento GLM): se ha utilizado para evaluar la evolución en el tiempo de las variables analizadas en el estudio en los

grupos de perros para los que se dispone de seguimiento tras la administración de la doxiciclina (aquellos perros que se han incluido en el ensayo clínico de la administración del fármaco) o, dicho de otra forma, se ha empleado para el análisis del comportamiento de los grupos de un factor inter-sujetos (que, en nuestro caso es el que los perros pertenezcan al Grupo 1 de perros sanos o al Grupo 2 de perros con EMC) en un factor intra-sujeto (tiempo, evolución en el tiempo de las variables tras la administración de doxiciclina) (Ferrán Aranaz 1996).

Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$. Para una distribución normal, los residuos brutos debían ser superiores a 1,96 e inferiores a -1,96, para que la frecuencia fuera estadísticamente superior o inferior, respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES

Los 167 animales fueron incluidos en los tres grupos descritos previamente: Grupo 1 o grupo de perros sanos; Grupo 2 o grupo de perros con EMC; y Grupo 3 o grupo de perros con otras patologías, diferentes a la EMC.

➤ Grupo 1

Está formado por todos aquellos **perros sanos** del estudio y cuenta con un total de **47 animales** que cumplían los criterios de inclusión para este grupo descritos en el apartado 4.3.4. del capítulo de materiales y métodos de la presente tesis doctoral. En la tabla 4 se ha reflejado la relación de perros incluidos en este grupo, que han sido identificados con los números de registro 1 a 47.

Tabla 4: Relación de los perros sanos incluidos en el estudio (Grupo 1)

NºREGISTRO	Raza	Edad (años)	Sexo	Peso (kg)	Tipo de patología
1	Mestizo	5	Macho	30	Ninguna
2	Mestizo	5	Macho	30	Ninguna
3	West Highland White Terrier	7	Hembra	8,5	Ninguna
4	West Highland White Terrier	5	Macho	11	Ninguna
5	Beagle	2	Macho	14	Ninguna
6	Beagle	2	Macho	14	Ninguna
7	Beagle	2	Hembra	13	Ninguna
8	Beagle	2	Hembra	13	Ninguna
9	Beagle	2	Hembra	13	Ninguna
10	Beagle	2	Hembra	13	Ninguna
11	Labrador retriever	6	Hembra	26	Ninguna
12	Mastín español	1,5	Hembra	40	Ninguna
13	Mestizo	0,5	Hembra	14,3	Ninguna
14	Boxer	0,5	Macho	21,1	Ninguna
15	Boxer	0,5	Macho	20	Ninguna
16	Mestizo	0,5	Hembra	17	Ninguna
17	Galgo español	1,5	Hembra	23	Ninguna
18	Galgo español	4	Hembra	25	Ninguna
19	Galgo español	4	Hembra	25	Ninguna
20	Galgo español	4	Macho	25	Ninguna
21	Galgo español	4	Hembra	25	Ninguna
22	Galgo español	4	Hembra	25	Ninguna
23	Galgo español	4	Hembra	25	Ninguna
24	Galgo español	4	Macho	25	Ninguna
25	Galgo español	4	Hembra	25	Ninguna
26	Galgo español	4	Macho	25	Ninguna
27	Galgo español	4	Macho	25	Ninguna

28	Galgo español	4	Macho	25	Ninguna
29	Galgo español	4	Macho	25	Ninguna
30	Pastor Alemán	4	Hembra	35	Ninguna
31	Pastor Alemán	8	Hembra	35	Ninguna
32	Pastor Alemán	7	Macho	35	Ninguna
33	Pastor Alemán	8	Hembra	35	Ninguna
34	Pastor Alemán	6	Macho	35	Ninguna
35	Pastor Alemán	3,5	Hembra	35	Ninguna
36	Pastor Alemán	6	Macho	35	Ninguna
37	Pastor Alemán	4,5	Macho	35	Ninguna
38	Pastor Alemán	5	Macho	35	Ninguna
39	Pastor Alemán	7,5	Macho	35	Ninguna
40	Pastor Alemán	3	Macho	35	Ninguna
41	Beagle	0,7	Macho	11	Ninguna
42	Beagle	0,7	Macho	11	Ninguna
43	Beagle	0,7	Macho	11	Ninguna
44	Beagle	0,7	Macho	11	Ninguna
45	Beagle	0,7	Hembra	11	Ninguna
46	Beagle	0,7	Hembra	11	Ninguna
47	Beagle	0,7	Hembra	11	Ninguna

➤ Grupo 2

El Grupo 2 está constituido por los perros incluidos en el estudio que fueron diagnosticados de **EMC** y cuenta con un total de **37 animales**. Todos ellos cumplían los criterios de inclusión descritos para los perros con EMC en el apartado 4.3.4. de esta tesis doctoral. En la Tabla 5 se ha reflejado la relación de perros incluidos en el Grupo 2 de este estudio, identificados con los números de registro 48 a 84.

Tabla 5: Relación de perros con EMC incluidos en el estudio (Grupo 2)

NºREGISTRO	Raza	Edad (años)	Sexo	Peso (kg)	Tipo de patología
48	Caniche	8	Hembra	7	EMC
49	Bulldog inglés	2,5	Hembra	27	EMC
50	Cocker spaniel inglés	10	Hembra	11	EMC
51	Teckel	4	Macho	8,5	EMC
52	Setter irlandés	12	Hembra	28	EMC
53	Spaniel Bretón	3	Macho		EMC
54	Sabueso	10	Hembra	38	EMC
55	Mestizo	7	Hembra	10	EMC
56	Mastín español	4	Hembra	60	EMC
57	Mastín español	3	Macho	60	EMC
58	Mastín español	5	Hembra	40	EMC
59	Mestizo	10	Macho	10	EMC
60	Labrador retriever	7	Macho	30	EMC
61	Labrador retriever	3	Hembra	30	EMC
62	Sabueso	9	Macho	30	EMC

63	Podenco	6	Hembra	18	EMC
64	Mestizo	10	Hembra	10	EMC
65	Mestizo	6	Hembra	21,8	EMC
66	Mestizo	3,5	Macho	35	EMC
67	Mestizo	3	Hembra	10	EMC
68	Teckel	9	Hembra	6,7	EMC
69	Yorkshire Terrier	9	Macho	1,8	EMC
70	Pastor Alemán	2	Macho	26	EMC
71	Labrador Retriever	4	Hembra	31	EMC
72	Mastín Español	5	Macho	40,2	EMC
73	Cocker Spaniel Inglés	9	Macho	13,5	EMC
74	Mestizo	1	Macho	15	EMC
75	Teckel	5	Hembra	10	EMC
76	Galgo Español	2	Hembra	25	EMC
77	Mestizo	2	Hembra	45	EMC
78	Mastín Español	0,6	Macho	30	EMC
79	Cocker Spaniel Inglés	9	Macho	17,2	EMC
80	Mastín Español	1	Hembra	40	EMC
81	Boxer	8	Macho	43	EMC
82	Mestizo	0,5	Macho	15	EMC
83	Mestizo	5	Hembra	15	EMC
84	Bulldog Inglés	11	Hembra	25	EMC

➤ Grupo 3

El Grupo 3 de este estudio está constituido por los perros que fueron atendidos por **diversas enfermedades** diferentes a la EMC y en él se incluyen un total de **83 animales** que han sido identificados con los números de registro 85 a 167 (Tabla 6).

Tabla 6: Relación de perros incluidos en el Grupo 3 del estudio

NºREGISTRO	Raza	Edad (años)	Sexo	Peso (kg)	Tipo de patología
85	Yorkshire Terrier	10	Macho	4,5	Mucocutánea
86	Boxer	11	Macho	30	Traumática
87	Bulldog Inglés	0,66	Macho	12,3	Mucocutánea
88	Shar Pei	1	Macho	19,5	Mucocutánea
89	Mestizo	1	Macho	9,9	Mucocutánea
90	Mestizo	1	Hembra	25	Traumática
91	West Highland White Terrier	0,33	Macho	4,8	Digestiva
92	Mestizo	8	Macho	51	Mucocutánea
93	Cocker Spaniel Inglés	10	Macho	23	Mucocutánea
94	Mestizo	4	Macho	24,8	Mucocutánea
95	Boxer	6	Macho	37,4	Traumática
96	Golden Retriever	4	Hembra	27,5	Mucocutánea

97	Cocker Spaniel Inglés	12	Macho	16,2	Mucocutánea
98	Cocker Spaniel Americano	5	Macho	15,5	Mucocutánea
99	Cocker Spaniel Inglés	3	Hembra	14	Traumática
100	Labrador Retriever	10	Hembra	31,4	Oncológica
101	Mestizo	12	Hembra	27	Mucocutánea
102	Husky Siberiano	12	Macho	36,6	Oncológica
103	Lakeland Terrier	12	Hembra	6	Oncológica
104	Braco Alemán	2	Hembra	27	Digestiva
105	Mestizo	8	Hembra	5,4	Oncológica
106	Pastor Alemán	7,5	Macho	47,6	Mucocutánea
107	Shar Pei	7	Hembra	25,2	Mucocutánea
108	West Highland White Terrier	1	Hembra	8,9	Traumática
109	Mestizo	12	Hembra	25,9	Oncológica
110	Bulldog Inglés	3	Macho	26,7	Digestiva
111	Caniche	12	Macho	8,9	Mucocutánea
112	Beagle	2	Macho	15,8	Traumática
113	Boxer	3,5	Hembra	24	Oncológica
114	Mestizo	0,66	Hembra	25	Traumática
115	Bobtail	6,5	Hembra	37,7	Oncológica
116	Dálmata	10,5	Macho	27,5	Oncológica
117	Pastor Alemán	5,5	Macho	31	Oncológica
118	Mestizo	7	Macho	52	Traumática
119	West Highland White Terrier	3	Macho	7,9	Traumática
120	Mestizo	9	Macho	40	Oncológica
121	Golden Retriever	11	Macho	30	Oncológica
122	Chow Chow	2	Hembra	30	Mucocutánea
123	Mestizo	9	Hembra	28,7	Digestiva
124	Yorkshire Terrier	1	Macho	5,4	Traumática
125	Schnauzer Miniatura	9	Hembra	7,9	Oncológica
126	Labrador Retriever	1	Macho	32,6	Traumática
127	Boxer	10	Hembra	22,4	Oncológica
128	Mestizo	11	Hembra	22,8	Oncológica
129	Husky Siberiano	12	Macho	26,7	Mucocutánea
130	Boxer	6	Hembra	30	Oncológica
131	West Highland White Terrier	12	Hembra	7,5	Oncológica
132	Cocker Spaniel Inglés	13	Macho	15,5	Oncológica
133	Mestizo	10	Hembra	22,3	Oncológica
134	Fox Terrier	11	Macho	11,8	Digestiva
135	Mestizo	9	Macho	59,9	Oncológica
136	Pastor Alemán	8	Macho	30	Digestiva
137	West Highland White Terrier	4	Macho	9,5	Digestiva
138	Pastor Alemán	1	Macho	29,3	Traumática
139	West Highland White Terrier	6	Hembra	7,9	Traumática
140	Cocker Spaniel Inglés	9	Hembra	11,4	Oncológica
141	Labrador Retr.	6	Hembra	30	Traumática

142	Dálmata	1	Hembra	19,1	Digestiva
143	Rottweiler	4	Macho	42,7	Mucocutánea
144	Cocker Spaniel Inglés	12	Macho	15,1	Traumática
145	Mestizo	14	Hembra	12,2	Oncológica
146	Husky Siberiano	11	Hembra	27,3	Digestiva
147	Mestizo	14	Hembra	7	Oncológica
148	Yorkshire Terrier	1	Macho	2,3	Digestiva
149	Bulldog Inglés	5	Macho	31	Digestiva
150	Mestizo	12	Macho	6,6	Digestiva
151	Maltés	3	Macho	3,9	Digestiva
152	Alaskan Malamute	1	Hembra	24	Digestiva
153	Cairn Terrier	9	Hembra	5,1	Digestiva
154	Golden Retriever	3	Hembra	27,2	Digestiva
155	Bulldog Francés	2	Hembra	13	Traumática
156	Spaniel Bretón	13	Hembra	22	Oncológica
157	Maltés	6	Hembra	3,8	Oncológica
158	Bulldog Inglés	8	Hembra	27	Oncológica
159	Cocker Spaniel Americano	11	Hembra	12,2	Oncológica
160	Chow Chow	6	Hembra	19	Digestiva
161	Mestizo	7	Macho	36	Digestiva
162	Cocker Spaniel Inglés	10	Hembra	14	Oncológica
163	Pastor Alemán	2	Macho	27,6	Digestiva
164	Doberman	7	Macho	23,7	Digestiva
165	Mestizo	10	Macho	15,2	Oncológica
166	Mestizo	7	Macho	30	Traumática
167	Pastor Alemán	4	Macho	35	Mucocutánea

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS

Como se ha descrito previamente, la población de perros **sanos** de este estudio está constituida por **47 animales**, que han sido incluidos en el Grupo 1.

5.2.1. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS

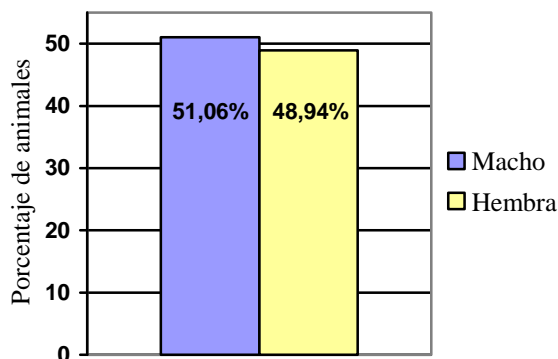
5.2.1.1. Distribución en función del sexo

La distribución de los perros sanos objeto de nuestro estudio en función del sexo queda reflejada en la tabla 7 y gráfico 1.

Los animales sanos incluidos en el estudio eran en un 51,06% machos y en un 48,94% hembras.

Tabla 7 y gráfico 1: Distribución de los 47 animales sanos en función del sexo

Sexo	Número de animales	Porcentaje
Macho	24	51,06
Hembra	23	48,94



5.2.1.2. Distribución en función de la edad

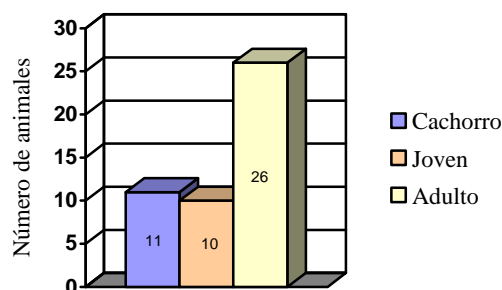
La edad media de los perros sanos incluidos en este estudio es de 3,41 años, siendo el mínimo de 5 meses y el máximo de 8 años.

Los 47 perros sanos del Grupo 1 fueron clasificados en 3 grupos según su edad: cachorros (aquellos animales que tenían menos de 1 año al inicio del estudio); jóvenes (animales de más de 1 año hasta 3,5 años); y adultos (de 4 a 8 años).

En la tabla 8 y gráfico 2 puede observarse la distribución de los animales de esta población en función de estos grupos de edad.

Tabla 8 y gráfico 2: Distribución de los perros sanos en función de los grupos de edad establecidos

Grupo de edad	Número de perros	Porcentaje
Cachorro	11	23,40
Joven	10	21,27
Adulto	26	55,31

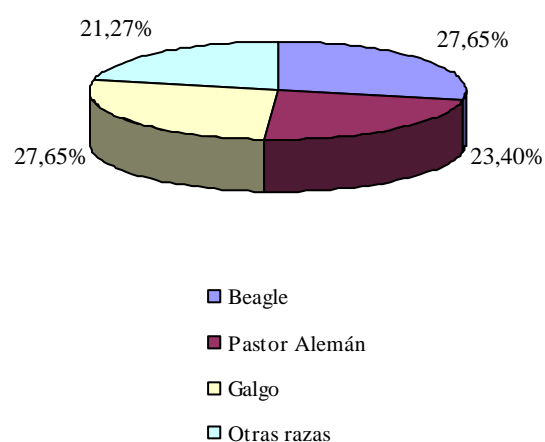


5.2.1.3. Distribución en función de la raza

La distribución de los 47 perros sanos incluidos en este estudio en función de su raza puede observarse en la tabla 9 y en el gráfico 3.

Tabla 9 y gráfico 3: Distribución de los perros sanos en función de la raza

Raza		Número de perros	Porcentaje
Beagle		13	27,65%
Pastor Alemán		11	23,40%
Galgo		13	27,65%
Otras razas	Mestizo	4	21,27%
	West Highland White Terrier	2	
	Boxer	2	
	Labrador Retriever	1	
	Mastín Español	1	



5.2.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS

Las variables estudiadas para los 47 perros incluidos en la población de perros sanos de este estudio incluyen variables de la analítica sanguínea básica (hematología y bioquímica), proteinograma, inmunofenotipo caracterizado mediante citometría de flujo y concentración plasmática de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10, si bien estas últimas determinaciones de la concentración de dichas citocinas no han podido realizarse en todos los casos.

5.2.2.1. Analítica sanguínea básica y proteinograma

Tras la toma de muestras de sangre de cada perro se realizó una analítica sanguínea básica que incluyó la realización de un estudio hematológico completo, medición de la

glucemia, valoración de urea y creatinina y determinación de ALT (o GPT). Los resultados obtenidos se reflejan en las tablas 10 y 11.

Tabla 10: Valores de la hematología de los perros sanos del estudio. **A:** Eritrograma, índices eritrocitarios y serie plaquetar. **B:** Recuento y fórmula leucocitarios.

A:	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Glóbulos rojos $\times 10^6/\mu\text{l}$	7,355	0,829	0,122	7,109	7,602	5,89	8,79
Hemoglobina (g/dl)	17,58	2,166	0,323	16,93	18,24	14	22
Hematocrito (%)	52,404	5,74	0,855	50,68	54,129	40,9	64
V.C.M. (fl)	71,028	2,232	0,329	70,365	71,691	67	75
H.C.M. (pg)	23,898	0,82	0,125	23,645	24,15	22,4	25,6
C.H.C.M. (g/dl)	33,55	1,205	0,178	33,2	33,91	31	36
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{l}$	246,47	75,667	11,539	223,18	269,75	132	415

B:	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{l}$	9,58	2,87	0,43	8,71	10,45	3,81	16,76
Neutrófilos/ μl	5612,36	1876,99	282,97	5041,70	6183,02	2355,28	10055,76
Neutrófilos (%)	59,71	8,05	1,19	57,32	62,10	44,80	73,50
Linfocitos/ μl	2839,46	955,31	140,85	2555,78	3123,16	941,07	4776,00
Linfocitos (%)	29,22	7,26	1,06	27,09	31,36	16,00	42,50
Monocitos/ μl	538,57	224,07	33,04	472,03	605,11	208,00	1026,72
Monocitos (%)	5,21	1,44	0,22	4,77	5,65	2,90	9,30
Eosinófilos/ μl	459,41	346,18	52,79	352,87	565,95	22,36	1541,33
Eosinófilos (%)	4,77	3,25	0,49	3,78	5,76	0,30	11,40
Basófilos/ μl	11,07	9,23	1,34	8,36	13,78	0,00	37,00
Basófilos (%)	0,11	0,08	0,01	0,08	0,13	0,00	0,00

Tabla 11: Valores de la bioquímica sanguínea de los perros sanos

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Glucosa (mg/dl)	74,570	21,719	3,168	68,200	80,950	51	121
Urea (mg/dl)	20,255	7,973	1,163	17,914	22,596	6,2	40,0
Creatinina (mg/dl)	0,840	0,151	0,022	0,795	0,885	0,5	1,2
GPT (U/l)	48,630	20,412	3,010	42,570	54,690	16	108

El estudio electroforético de las proteínas de los 47 perros sanos incluidos en el estudio ofreció el siguiente resultado (tabla 12):

Tabla 12: Resultados del proteinograma de la población de perros sanos

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Proteínas totales (g/dl)	6,194	0,640	0,093	6,006	6,382	5,2	8,0
Albúmina (%)	53,578	4,581	0,683	52,201	54,954	43,0	62,1
Albúmina (g/dl)	3,276	0,285	0,042	3,190	3,362	2,7	3,7
Globulinas (g/dl)	2,85	0,474	0,071	2,71	3,00	2	4
α1-globulinas (%)	4,584	0,742	0,113	4,355	4,813	3,30	6,40
α1-globulinas (g/dl)	0,281	0,040	0,006	0,269	0,293	0,190	0,350
α2-globulinas (%)	12,612	2,485	0,370	11,865	13,358	7,90	17,40
α2-globulinas (g/dl)	0,771	0,186	0,028	0,715	0,828	0,410	1,110
β-globulinas (%)	21,908	3,250	0,479	20,943	22,874	16,60	29,70
β-globulinas (g/dl)	1,332	0,241	0,036	1,260	1,405	0,950	1,840
γ-globulinas (%)	7,325	2,213	0,333	6,652	7,997	3,80	12,40
γ-globulinas (g/dl)	0,472	0,183	0,027	0,418	0,527	0,220	1,020
Cociente A/G	1,162	0,201	0,030	1,100	1,223	0,750	1,540

5.2.2.2. Inmunofenotipo

Como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, a partir de las muestras de sangre recogidas con el anticoagulante EDTA se procedió a realizar el estudio del inmunofenotipo a través del marcaje de los linfocitos caninos con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD21 y anti-CMHII y su posterior análisis en un citómetro de flujo. Los resultados obtenidos en el estudio inmunofenotípico de la población de perros sanos incluidos en nuestro estudio se han reflejado en las tablas 13A y 13B.

Tabla 13: Valores resultantes del inmunofenotipaje en la población de perros sanos del estudio. **A:** Resultados en valores porcentuales de las diferentes poblaciones linfocitarias y cociente CD4/CD8. **B:** Resultados en valores absolutos respecto al total de linfocitos.

A:	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
% de linfocitos T (CD3+)	65,698	5,884	0,897	63,887	67,509	55,590	80,130
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	37,916	4,829	0,719	36,466	39,367	29,20	47,00
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	19,754	7,109	1,059	17,618	21,890	7,350	35,30
% de linfocitos B (CD21+)	18,410	6,958	1,037	16,320	20,501	4,930	31,730
% de linfocitos CMHII+	89,016	5,202	0,775	87,453	90,579	78,70	97,200
% de linfocitos CD3-CD21-	15,154	4,887	0,728	13,685	16,622	6,850	27,540
Cociente CD4/CD8	2,092	0,962	0,143	1,803	2,381	0,770	4,100

B:	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Linfocitos T (CD3+)/ μ l	1869,252	547,670	81,641	1704,714	2033,791	933,620	3083,380
Linfocitos Th (CD3+CD4+)/ μ l	1080,149	400,130	58,364	962,667	1197,632	290,130	1986,810
Linfocitos Tc (CD3+CD8+)/ μ l	506,199	171,441	26,144	453,437	558,960	189,840	844,610
Linfocitos B (CD21+)/ μ l	527,574	318,707	47,510	431,823	623,324	39,040	1198,290
Linfocitos CMHII+/ μ l	2538,804	977,528	144,128	2248,514	2829,094	849,690	4642,270
Linfocitos CD3-CD21-/ μ l	417,554	167,206	24,925	367,319	467,789	128,230	896,700

5.2.2.3. Concentración plasmática de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos mediante ELISA de las concentraciones plasmáticas de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10, indicando el número de perros (N) del que se dispone de cada valor.

Tabla 14: Valores de concentración de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 en sangre periférica de la población de perros sanos del estudio

	Media	N	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Concentración IFN- γ (pg/ml)	47,851	19	26,552	6,091	35,053	60,649	9,06	103,24
Concentración IL-6 (pg/ml)	47,089	16	35,338	8,834	28,258	65,919	0,00	117,506
Concentración IL-10 (pg/ml)	0,550	29	1,713	0,318	0,00	1,200	0,00	8,00
Concentración TNF- α (pg/ml)	13,201	20	13,291	2,972	6,981	19,422	0,00	48,56

5.2.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA EDAD, EL SEXO Y LA RAZA SOBRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS

A continuación se reflejan los resultados obtenidos de la influencia del sexo, la edad y la raza sobre los parámetros estudiados que se encuentran más directamente relacionados con el sistema inmunitario, como son la fórmula leucocitaria, el proteinograma, el inmunofenotipo y la concentración de citocinas.

En la presente memoria únicamente indicaremos las relaciones que han resultado ser estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%.

5.2.3.1. Sexo

En relación con el sexo del animal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los machos y las hembras para ninguna de las variables analizadas.

5.2.3.2. Edad

En cuanto a la edad del animal, se observó la existencia de relaciones estadísticamente significativas entre el grupo de edad al que pertenecían los animales sanos del estudio (cachorro, joven y adulto) y ciertas variables. En concreto, se hallaron relaciones estadísticamente significativas entre la edad del animal y las siguientes variables:

- **Porcentaje de neutrófilos:** en este estudio, se ha observado la existencia de una relación estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95% entre la edad del perro y su porcentaje de neutrófilos en sangre periférica ($p=0,001$). En la tabla 15 quedan detallados los resultados de esta variable en los tres grupos de edad.

Gracias al empleo del test de Bonferroni, que realiza comparaciones de múltiples medias, hemos podido determinar entre qué grupos de edad en concreto existen diferencias estadísticamente significativas para esta variable. Así, se observa que el porcentaje de neutrófilos aumenta significativamente con la edad, de modo que los cachorros presentan un menor valor porcentual de estas células (53,17%) que los adultos (63,13%) en la población de perros sanos estudiada.

Tabla 15: Porcentaje de neutrófilos en función de la edad en perros sanos

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Neutrófilos (%)	Cachorro	53,170	6,907	2,184	48,228	58,112	44,8	68,0
	Joven	57,340	7,484	2,366	51,986	62,694	45,0	70,1
	Adulto	63,131	6,907	1,354	60,341	65,921	47,2	73,5
	Total	59,707	8,047	1,186	57,317	62,096	44,8	73,5

- Valor absoluto y relativo de linfocitos: en la población de perros sanos incluida en este estudio, se ha observado la existencia de una relación estadísticamente significativa para un nivel de significación del 95% entre la edad del animal y el valor, tanto porcentual como absoluto, de linfocitos que poseen en sangre periférica ($p=0,001$ y $p=0,003$, respectivamente). En la tabla 16 pueden observarse los resultados obtenidos para estas variables del estudio en los tres grupos de edad establecidos.

En concreto, el test de Bonferroni indica que la población de perros sanos incluida en el grupo de los cachorros mostró un mayor porcentaje de linfocitos en sangre periférica (35,73%) que el grupo de adultos (26,56%). En cuanto al valor absoluto, los cachorros presentan un mayor número de linfocitos/ μl (3702,07/ μl) que los jóvenes (2718,15/ μl) y que los adultos (μl).

Tabla 16: Valores relativos y absolutos de linfocitos en sangre periférica de la población de perros sanos del estudio en función de su edad

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Linfocitos (%)	Cachorro	35,773	5,607	1,690	32,006	39,540	23,2	41,1
	Joven	28,940	6,400	2,023	24,362	33,518	19,1	39,8
	Adulto	26,562	6,596	1,293	23,897	29,226	16,0	42,5
	Total	29,223	7,264	1,059	27,090	31,356	16,0	42,5

Linfocitos/μl	Cachorro	3702,079	538,681	170,346	3316,729	4087,428	2571,93	4381,92
	Joven	2718,159	841,483	266,100	2116,198	3320,120	1598,20	4776,00
	Adulto	2554,353	946,190	185,563	2172,178	2936,528	941,07	4616,04
	Total	2839,468	955,313	140,853	2555,775	3123,161	941,07	4776,00

- Valor absoluto y relativo de las gamma globulinas: se ha observado que los valores absolutos y relativos de las γ -globulinas en los perros sanos se encuentran influenciados, para un nivel de significación del 95%, por la edad del animal ($p=0,001$ y $p=0,000$, respectivamente). En la tabla 17 se han reflejado los resultados de los valores porcentuales y absolutos de las γ -globulinas obtenidos en los tres grupos de edad estudiados en la población de perros sanos del estudio.

En concreto, se observa que los cachorros presentan menores valores tanto absolutos como relativos de γ -globulinas (0,3009 g/dl y 5,191%) que los jóvenes (0,4944 g/dl y 8,078%) y los adultos (0,5277 g/dl y 8,020%).

Tabla 17: Valores porcentuales y absolutos de globulinas en los perros sanos del estudio en función del grupo de edad al que pertenezcan

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
γ-globulinas (%)	Cachorro	5,191	1,202	0,362	4,383	5,999	3,8	7,7
	Joven	8,078	1,707	0,569	6,766	9,390	5,8	10,9
	Adulto	8,020	2,147	0,438	7,113	8,927	4,1	12,4
	Total	7,325	2,213	0,333	6,652	7,997	3,8	12,4
γ-globulinas (g/dl)	Cachorro	0,300	0,069	0,020	0,254	0,347	0,22	0,42
	Joven	0,494	0,110	0,036	0,409	0,579	0,35	0,69
	Adulto	0,537	0,193	0,037	0,459	0,615	0,24	1,02
	Total	0,472	0,183	0,027	0,418	0,527	0,22	1,02

- Valor absoluto de linfocitos T (CD3+) por μ l: se ha observado que la edad del animal influye de forma estadísticamente significativa para un nivel de significación del 95% en el número de linfocitos que expresan CD3 en su

superficie ($p=0,029$). En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos para el valor absoluto de estos linfocitos en sangre periférica en los diferentes grupos de edad en la población de perros sanos de nuestro estudio.

Parece existir estadísticamente un mayor número de linfocitos T (CD3+) en sangre periférica en los cachorros (2243,30/ μ l) que en los perros adultos (1735,73/ μ l).

Tabla 18: Valor absoluto de linfocitos T en sangre periférica en los diferentes grupos de edad de los perros sanos del estudio

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Linfocitos T (CD3+)/ μ l	Cachorro	2243,306	424,803	128,082	1957,919	2528,693	1590,73	2869,59
	Joven	1778,228	556,670	176,034	1380,009	2176,446	1024,17	3083,38
	Adulto	1735,738	533,821	108,965	1510,325	1961,151	933,62	2778,99
	Total	1869,252	547,670	81,641	1704,714	2033,791	933,62	3083,38

- Valor porcentual y absoluto de los linfocitos Th (CD3+CD4+): se ha observado que existe una influencia significativa al 95% de intervalo de confianza de la edad del animal sobre el porcentaje de linfocitos Th en sangre periférica ($p=0,026$), así como sobre el valor absoluto de estos linfocitos ($p=0,000$). En la tabla 19 pueden observarse los resultados de porcentajes y valores absolutos de linfocitos Th obtenidos para los perros sanos de diferentes edades.

En concreto, el test de Bonferroni ha mostrado que existe un descenso del porcentaje de linfocitos Th en los perros adultos (media de porcentaje de linfocitos Th en sangre periférica de 36,52%) en comparación con los cachorros (media de linfocitos Th: 41,152%).

En cuanto al valor absoluto, se ha observado que las diferencias significativas existentes se deben a las diferencias que se observan entre el valor de los linfocitos Th que presentan los cachorros (media de 1534,7982/ μ l) y el que presentan los jóvenes (1036,7060/ μ l) y los adultos (904,5073/ μ l), observándose un descenso en el número de estos linfocitos con la edad.

Tabla 19: Valores relativos y absolutos de linfocitos Th (CD3+CD4+) según la edad del animal

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Cachorro	41,152	4,367	1,316	38,218	44,086	35,10	47,00
	Joven	37,842	3,097	1,032	35,461	40,223	32,90	41,60
	Adulto	36,520	4,978	0,995	34,465	38,575	29,20	45,50
	Total	37,916	4,829	0,719	36,466	39,367	29,20	47,00
Linfocitos Th (CD3+CD4+)/ μ l	Cachorro	1534,79	197,737	59,620	1401,956	1667,640	1167,14	1755,81
	Joven	1036,70	421,363	133,246	735,280	1338,131	581,56	1986,81
	Adulto	904,50	302,067	59,240	782,499	1026,515	290,13	1482,45
	Total	1080,14	400,130	58,364	962,667	1197,632	290,13	1986,81

- Valor porcentual de linfocitos Tc (CD3+CD8+): los resultados obtenidos muestran la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la edad del animal y el porcentaje de linfocitos Tc que presenta en sangre periférica ($p=0,000$). En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos para el porcentaje de los linfocitos Tc en los tres grupos de edad.

En este caso se observa la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de linfocitos Tc presentes en sangre periférica en los cachorros (media de 12,59%) y en los adultos (23,73%) y, a su vez, entre el valor en los jóvenes (18,08%) y los adultos. Parece existir, por tanto, un aumento del porcentaje de linfocitos Tc a lo largo del tiempo.

Tabla 20: Resultados porcentuales de linfocitos Tc en los diferentes grupos de edad de los perros sanos

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Cachorro	12,594	3,364	1,014	10,334	14,854	7,350	20,120
	Joven	18,082	5,444	1,721	14,187	21,976	12,140	29,780
	Adulto	23,733	6,158	1,257	21,133	26,334	11,080	35,300
	Total	19,754	7,109	1,059	17,618	21,890	7,350	35,300

- Cociente CD4/CD8: se ha observado una asociación estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95% entre la edad del perro y el cociente de linfocitos CD4+/CD8+ ($p=0,000$). En la tabla 21 se muestran los resultados del cociente CD4/CD8 obtenidos en la población sana del estudio en función de su edad.

Gracias al empleo del test de Bonferroni, se ha observado que el valor del cociente CD4/CD8 es superior en los cachorros (3,14) que en los adultos (1,63).

Tabla 21: Cociente CD4/CD8 en los grupos de edad establecidos en la población de perros sanos

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Cociente CD4/CD8	Cachorro	3,147	0,622	0,207	2,669	3,626	2,160	3,820
	Joven	2,336	0,795	0,251	1,767	2,904	1,200	3,790
	Adulto	1,633	0,796	0,156	1,312	1,955	0,770	4,100
	Total	2,092	0,962	0,143	1,803	2,381	0,770	4,100

- Valor absoluto de linfocitos B (CD21+) por μl de sangre periférica: en nuestra población de estudio se observa una relación estadísticamente significativa para un nivel de significación del 95% entre la edad del animal y el número de linfocitos B CD21+ por μl de sangre periférica ($p=0,039$). En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos para esta variable en los tres grupos de edad establecidos en nuestro estudio.

Al igual que lo observado para los linfocitos T, el valor absoluto de los linfocitos B CD21+ parece ser mayor en los cachorros (749,56/ μl) que en los adultos (441,61/ μl).

Tabla 22: Valores absolutos de linfocitos B CD21+ en sangre periférica de perros sanos en función de su edad

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Linfocitos B (CD21+)/ μ l	Cachorro	749,560	342,638	114,21	486,184	1012,935	261,37	1152,39
	Joven	551,287	298,957	94,538	337,425	765,148	276,64	1198,29
	Adulto	441,612	288,752	56,628	324,982	558,241	39,04	1150,75
	Total	527,574	318,707	47,510	431,823	623,324	39,04	1198,29

- Valor absoluto de linfocitos en sangre periférica que expresan CMH de clase II en su superficie: se ha observado que la edad de los perros en la población sana está relacionada estadísticamente para un valor de significación del 95% con el número absoluto de linfocitos en sangre periférica que expresan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en su superficie ($p=0,002$). En la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Se observa un menor valor de linfocitos que expresan CMHII en su superficie en los perros jóvenes (2336,67/ μ l) y adultos (2258,75/ μ l) con respecto a los cachorros (3469,05/ μ l).

Tabla 23: Relación del número de linfocitos que expresan CMHII en su superficie en los tres grupos de edad establecidos en la población sana

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Linfocitos CMHII+/ μ l	Cachorro	3469,053	643,582	203,51	3008,662	3929,444	2379,03	4410,56
	Joven	2336,673	947,497	299,62	1658,874	3014,471	1305,88	4642,27
	Adulto	2258,758	896,469	175,81	1896,666	2620,850	849,69	4464,63
	Total	2538,804	977,528	144,12	2248,514	2829,094	849,69	4642,27

5.2.3.3. Raza

Para poder evaluar la posible influencia de la raza del animal sobre las diferentes variables analizadas, se clasificaron los animales sanos del estudio en 4 categorías: Beagle (con 13 animales), Pastor Alemán (11 perros), Galgo Español (13 animales) y Otras razas (10 animales). Se hallaron diferencias significativas en varias de las variables analizadas relacionadas de forma directa con el sistema inmunitario entre los diferentes grupos de razas estudiadas.

En las tablas 24 a 27 se muestran aquellas variables para las que se ha encontrado relación estadísticamente significativa al 95% de intervalo de confianza con la raza.

Tabla 24: Valores de la fórmula leucocitaria de los perros sanos en lo que se ha encontrado influencia estadísticamente significativa de la raza. Se indica también el valor de p

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
% de neutrófilos	Beagle	52,700	5,065	1,462	49,481	55,919	44,800	62,000	0,001
	Galgo	62,862	6,672	1,850	58,829	66,894	53,200	73,400	
	Otra	59,090	10,084	3,188	51,876	66,304	45,000	73,500	
	Pastor Alemán	64,182	4,898	1,477	60,891	67,473	56,300	72,300	
	Total	59,707	8,047	1,186	57,317	62,096	44,800	73,500	
Neutrófilos / μ l	Beagle	4626,150	867,192	240,515	4102,116	5150,194	3129,300	6342,600	0,021
	Galgo	5351,250	1791,495	496,871	4268,667	6433,847	2453,640	8499,840	
	Otra	6020,480	2331,821	777,273	4228,090	7812,884	2355,280	9717,200	
	Pastor Alemán	7005,910	1869,150	623,050	5569,153	8442,666	4712,310	10055,700	
	Total	5612,360	1876,994	282,967	5041,703	6183,021	2355,280	10055,700	
% de linfocitos	Beagle	34,046	5,398	1,497	30,784	37,308	25,700	41,100	0,003
	Galgo	27,146	5,953	1,651	23,548	30,744	18,800	35,000	
	Otra	31,020	9,538	3,016	24,196	37,844	17,900	42,500	
	Pastor Alemán	24,345	4,258	1,283	21,485	27,206	16,000	31,700	
	Total	29,223	7,264	1,059	27,090	31,356	16,000	42,500	

% de eosinófilos	Beagle	7,225	2,510	0,724	5,630	8,820	3,400	11,400	0,000
	Galgo	1,783	2,036	0,588	0,489	3,077	0,300	5,900	
	Otra	4,022	1,845	0,615	2,604	5,441	2,100	8,000	
	Pastor Alemán	5,964	3,339	1,007	3,720	8,207	2,200	10,200	
	Total	4,770	3,248	0,489	3,783	5,758	0,300	11,400	
Eosinófilos /μl	Beagle	691,216	268,494	74,466	528,966	853,465	362,440	1184,370	0,000
	Galgo	146,364	164,131	47,380	42,080	250,648	22,360	475,540	
	Otra	413,710	192,960	64,320	265,387	562,032	208,000	808,000	
	Pastor Alemán	587,674	437,681	145,893	251,243	924,105	185,460	1541,330	
	Total	459,410	346,175	52,791	352,873	565,947	22,360	1541,330	

En relación con los parámetros de la fórmula leucocitaria, parece que la raza del perro ejerce una influencia sobre los neutrófilos, tanto en su valor relativo como en el absoluto ($p=0,001$ y $p=0,021$, respectivamente), sobre el porcentaje de linfocitos ($p=0,000$) y sobre los eosinófilos, en valor relativo y absoluto ($p=0,000$ y $p=0,000$, respectivamente).

Gracias al empleo del test de Bonferroni se ha podido establecer en cada caso entre qué grupos raciales en concreto se encuentran diferencias estadísticamente significativas. El efecto de la raza sobre los neutrófilos queda reflejado en un menor valor porcentual y absoluto de estas células en los Beagles (52,70% y 4626,155/ μ l, respectivamente) en comparación con los Pastores Alemanes (64,182% y 7005,91/ μ l, respectivamente). Además, el porcentaje de estas células en los Beagles es también inferior al observado en los Galgos (62,86%).

El porcentaje de linfocitos en sangre periférica de los perros sanos incluidos en este estudio es significativamente superior para un nivel de confianza del 95% en los Beagles (34,046%) que en los Pastores Alemanes (24,345%).

En cuanto al efecto que parece ejercer la raza sobre los eosinófilos presentes en sangre periférica de los perros sanos, se manifiesta en un menor valor porcentual y absoluto en los Galgos (1,783% y 146,36 eosinófilos/ μ l) con respecto a los Beagles (7,225% y 691,21 eosinófilos/ μ l) y los Pastores Alemanes (5,964% y 587,67 eosinófilos/ μ l). Además, el porcentaje de estas células en los Beagles es mayor al que presentan los perros de otras razas (4,022%).

Tabla 25: Valores de las proteínas totales y del proteinograma que han mostrado asociación estadísticamente significativa (nivel de significación del 95%) con la raza. Se muestra el valor de p

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
γ-globulinas (%)	Beagle	6,215	1,573	0,436	5,264	7,166	4,30	8,70	0,002
	Galgo	6,450	1,011	0,291	5,807	7,093	4,10	7,70	
	Otra	8,068	2,965	0,937	5,947	10,189	3,80	12,40	
	Pastor Alemán	9,26	1,798	0,599	7,884	10,649	6,20	11,20	
	Total	7,325	2,213	0,333	6,652	7,997	3,80	12,40	
γ-globulinas (g/dl)	Beagle	0,373	0,099	0,027	0,313	0,434	0,25	0,54	0,000
	Galgo	0,378	0,063	0,018	0,338	0,418	0,24	0,48	
	Otra	0,471	0,177	0,056	0,344	0,597	0,22	0,67	
	Pastor Alemán	0,693	0,174	0,052	0,576	0,810	0,42	1,02	
	Total	0,472	0,183	0,027	0,418	0,527	0,22	1,02	
Cociente A/G	Beagle	1,131	0,129	0,035	1,053	1,209	0,84	1,40	0,001
	Galgo	1,338	0,178	0,053	1,217	1,458	0,90	1,54	
	Otra	1,166	0,203	0,064	1,020	1,311	0,78	1,40	
	Pastor Alemán	1,004	0,164	0,051	0,886	1,121	0,75	1,25	
	Total	1,162	0,201	0,030	1,100	1,223	0,75	1,54	

La concentración plasmática de γ -globulinas y el cociente Albúmina/Globulinas presentan una relación estadísticamente significativa con la raza del animal del estudio, como podemos observar en la tabla 25. Los valores de la p de cada una de las variables del proteinograma en relación con la raza se muestran también en la citada tabla.

Así, las γ -globulinas (tanto en valor porcentual como en valor absoluto) son mayores en los perros de raza Pastor Alemán (9,26% y 0,69 g/dl, respectivamente) que en los Beagles (6,21% y 0,37 g/dl, respectivamente) y los Galgos (6,45% y 0,37 g/dl, respectivamente), siendo también superior el valor absoluto en los Pastores Alemanes en comparación con los perros de otras razas (0,47 g/dl).

El cociente Albúmina/Globulinas es superior en los Galgos (1,33) en comparación con los Beagles (1,13) y los Pastores Alemanes (1,00).

Tabla 26: Valores de las variables del inmunofenotipo que se encuentran bajo la influencia de la raza del perro (para un 95% de intervalo de confianza). Se muestra el valor de p

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
% de linfocitos T (CD3+)	Beagle	62,388	3,995	1,204	59,703	65,072	55,590	69,240	0,029
	Galgo	65,624	6,010	1,735	61,805	69,443	56,230	74,340	
	Otra	65,259	6,824	2,158	60,377	70,140	57,300	80,130	
	Pastor Alemán	69,869	4,493	1,420	66,654	73,083	62,880	78,580	
	Total	65,698	5,884	0,897	63,887	67,509	55,590	80,130	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Beagle	13,210	3,398	0,942	11,156	15,264	7,350	19,560	0,000
	Galgo	23,104	6,622	1,911	18,896	27,312	12,660	35,300	
	Otra	18,451	6,609	2,090	13,723	23,178	11,080	29,580	
	Pastor Alemán	25,547	4,294	1,357	22,475	28,618	17,640	29,780	
	Total	19,754	7,109	1,059	17,618	21,890	7,350	35,300	
Linfocitos Tc (CD3+CD8+)/ μ l	Beagle	384,010	67,674	18,769	343,121	424,912	283,520	517,270	0,003
	Galgo	508,570	208,997	60,332	375,788	641,369	189,840	844,610	
	Otra	548,290	118,368	37,431	463,620	632,971	349,600	703,620	
	Pastor Alemán	648,550	168,590	59,605	507,609	789,498	430,470	837,290	
	Total	506,190	171,441	26,144	453,437	558,960	189,840	844,610	
% de linfocitos B (CD21+)	Beagle	22,893	5,362	1,547	19,486	26,300	15,730	31,730	0,023
	Galgo	17,501	7,570	2,185	12,691	22,311	6,620	29,410	
	Otra	18,643	7,876	2,490	13,008	24,277	7,220	29,780	
	Pastor Alemán	14,301	4,336	1,307	11,388	17,214	4,930	21,910	
	Total	18,410	6,958	1,037	16,320	20,501	4,930	31,730	
Cociente CD4/CD8	Beagle	3,009	0,768	0,231	2,492	3,525	1,690	3,820	0,000
	Galgo	1,695	0,757	0,210	1,237	2,152	0,870	3,580	
	Otra	2,353	0,974	0,308	1,656	3,049	1,250	4,100	
	Pastor Alemán	1,409	0,481	0,145	1,086	1,732	0,770	2,290	
	Total	2,092	0,962	0,143	1,803	2,381	0,770	4,100	

En el inmunofenotipaje se han hallado también ciertas relaciones estadísticamente significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre las variables reflejadas en la tabla 26 y las razas de los perros sanos de nuestro estudio. En concreto, parece que la raza puede influir sobre el porcentaje de linfocitos T (CD3+) ($p=0,029$), sobre el valor porcentual y absoluto de linfocitos Tc (CD3+CD8+) ($p=0,000$ y $p=0,003$, respectivamente), sobre el cociente CD4/CD8 ($p=0,000$) y sobre el porcentaje de linfocitos B (CD21+) ($p=0,023$).

Los perros de raza Pastor Alemán parecen poseer un porcentaje mayor de linfocitos T (que expresan CD3 en su superficie) (69,86%) que los Beagles (62,38%).

De la misma forma, los Pastores Alemanes muestran mayores valores porcentuales y absolutos (25,54% y 648,55/ μl) que los Beagles (13,21% y 384,01/ μl) para los linfocitos Tc (CD3+CD8+). Además, los Pastores Alemanes presentan porcentajes mayores de estos linfocitos que los perros de otras razas (18,45%) y el valor porcentual en los Galgos (23,10%) es también superior al de los Beagles.

El cociente CD4/CD8 que se ha hallado en los Beagles (3,00) es superior al de los Galgos (1,69) y los Pastores Alemanes (1,40). En los Pastores Alemanes este cociente es inferior, además, al hallado en otras razas de perros del estudio (2,35).

El porcentaje de linfocitos B CD21+ es superior en los perros de raza Beagle (22,89%) que en los Pastores Alemanes (14,30%).

Tabla 5: Valores de la concentración de IL-6 en las diferentes razas de perros sanos. Se muestra el valor de p

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
Concentración IL-6 (pg/ml)	Beagle	58,547	37,973	15,502	18,696	98,398	16,197	117,506	0,009
	Otra	71,571	18,053	9,026	42,844	100,298	53,411	91,292	
	Pastor Alemán	10,246	8,131	3,636	0,149	20,342	0,000	20,165	
	Total	45,920	36,257	9,360	25,840	65,998	0,000	117,506	

Se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% para el valor de la concentración plasmática de IL-6 en función de la

raza del animal ($p=0,009$), como puede observarse en la tabla 27. Así, los perros de raza Pastor Alemán muestran una menor concentración de este mediador proteico (10,24 pg/ml) que los Beagles (58,54 pg/ml) y que los perros de Otras razas (71,57 pg/ml) del estudio.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON EMC

La población de perros con EMC incluidos en este estudio está constituida por un total de **37 animales** que se han clasificado en el Grupo 2 siguiendo los criterios de inclusión descritos en el apartado de Materiales y Métodos de esta tesis doctoral.

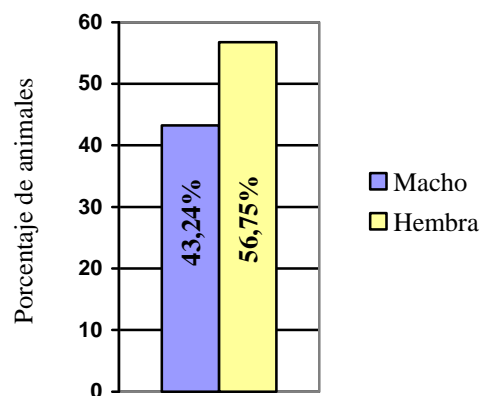
5.3.1. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON EMC

5.3.1.1. Distribución en función del sexo

De los 37 perros incluidos en la población de animales con EMC de este estudio, 16 eran machos y 21 hembras, como puede observarse en la tabla 28 y gráfico 4.

Tabla 28 y gráfico 4: Distribución en función del sexo de los perros con EMC incluidos en el estudio

Sexo	Número de animales	Porcentaje
Macho	16	43,24
Hembra	21	56,75



5.3.1.2. Distribución en función de la edad

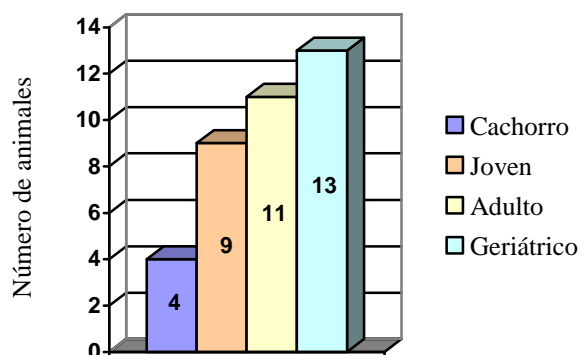
La edad media de los perros con EMC incluidos en este estudio es de 5,65 años, siendo la edad mínima de 6 meses y la edad máxima de 12 años.

Los 37 perros con EMC incluidos en el estudio fueron clasificados en 4 grupos de edad: cachorros (menores de 1 año); jóvenes (animales de más de 1 año hasta 3,5 años); adultos (de 4 a 8 años); y geriátricos (de más de 8 años).

En la tabla 29 y gráfico 5 queda reflejada la distribución de la población de perros con EMC del estudio en función del grupo de edad en el que se hubiesen incluido.

Tabla 29 y gráfico 5: Distribución de los perros con EMC en función de su edad

Grupo de edad	Número de perros	Porcentaje
Cachorro	4	10,81
Joven	9	24,32
Adulto	11	29,72
Geriátrico	13	35,13

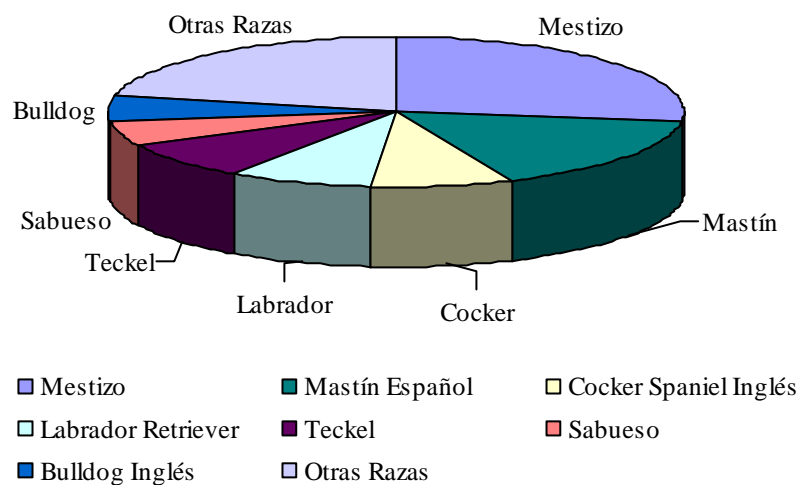


5.3.1.3. Distribución en función de la raza

De los perros con EMC incluidos en este estudio, 10 son mestizos (27,02%), 6 son Mastines Españoles (16,21%), 3 son de raza Cocker Spaniel Inglés (8,108%), 3 son de raza Labrador Retriever (8,108%), 3 son Teckel (8,108%), 2 son Sabuesos (5,40%), 2 son Bulldog Inglés (4,40%), 1 Pastor Alemán (2,70%), 1 Galgo Español (2,70%), 1 Bóxer (2,70%), 1 Spaniel Bretón (2,70%), 1 Podenco Ibicenco (2,70%), 1 Setter Irlandés (2,70%), 1 Yorkshire Terrier (2,70%) y 1 Caniche (2,70%) (Tabla 30 y Gráfico 6).

Tabla 6 y gráfico 6: Distribución de los perros con EMC en función de su raza

Raza	Número de perros
Mestizo	10
Mastín Español	6
Cocker Spaniel Inglés	3
Labrador Retriever	3
Teckel	3
Sabueso	2
Bulldog Inglés	2
Pastor Alemán	1
Galgo Español	1
Boxer	1
Spaniel Bretón	1
Podenco Ibicenco	1
Setter Irlandés	1
Yorkshire Terrier	1
Caniche	1



5.3.1.4. Distribución en función de la fase de la EMC

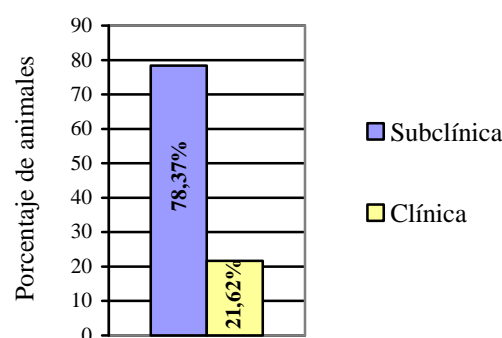
Como se describió previamente en el apartado 4.3.4. de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral, debido a la dificultad existente en la infección natural por *E. canis* para diferenciar entre las fases aguda, subclínica y crónica típicamente descritas para la enfermedad (Woody, Hoskins 1991), se decidió clasificar a los perros con EMC en función

de si se encontraban en la fase subclínica (es decir, eran asintomáticos) o si se encontraban, por el contrario, en una fase clínica (sin diferenciar entre aguda o crónica).

En este sentido, se han incluido en este trabajo 29 perros en la fase subclínica de la EMC (78,37%) y 8 en fase clínica (21,62%). Estos últimos presentaban una sintomatología variable, destacando la presencia de apatía (en 4 casos), anorexia (en 3 casos), pérdida de peso (en 5 casos) y/o síntomas hemorrágicos (en 4 casos), como epistaxis, presencia de petequias y equimosis o estros con sangrado más abundante de lo habitual.

Tabla 31 y gráfico 7: Distribución de los perros con EMC en función de la fase de la enfermedad

Fase de la EMC	Número de animales
Subclínica	29
Clínica	8



5.3.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON EMC

De la misma forma ya descrita para los perros sanos del estudio, para los 37 perros incluidos en la población de perros con EMC se han analizado las variables de la analítica sanguínea básica (hematología y bioquímica), proteinograma, inmunofenotipo y la concentración de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α .

5.3.2.1. Analítica sanguínea básica y proteinograma

Las tablas 32 a 34 muestran los resultados obtenidos en la población de perros con EMC para las diferentes variables estudiadas de la hematología y bioquímica básicas y estudio electroforético de las proteínas.

Tabla 32: Resultados de la hematología sanguínea en perros con EMC. **A:** resultados de las series eritroide y plaquetar. **B:** resultados de la serie leucocitaria

A:	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Glóbulos rojos $\times 10^6/\mu\text{l}$	6,391	1,245	0,204	5,975	6,806	4	9,32
Hemoglobina (g/dl)	14,62	2,906	0,478	13,65	15,59	8	21
Hematocrito (%)	45,833	9,127	1,5	42,789	48,876	24	62,6
V.C.M. (fl)	71,805	5,943	0,977	69,824	73,787	60	81,5
H.C.M. (pg)	22,876	1,409	0,231	22,406	23,346	19,8	26,2
C.H.C.M. (g/dl)	32	2,552	0,42	31,15	32,85	29	38
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{l}$	169,03	88,218	15,64	137,749	200,311	5	433

B:	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{l}$	10,586	6,487	1,066	8,423	12,749	3,9	43,05
Neutrófilos/ μl	6261,994	5307,771	872,592	4492,295	8031,693	2808	35860,65
Neutrófilos (%)	59,405	14,942	2,456	54,423	64,388	23,5	87
Linfocitos/ μl	3048,683	2509,175	412,505	2212,082	3885,284	480	14960,78
Linfocitos (%)	29,211	13,936	2,291	24,564	33,857	8	72,1
Monocitos/ μl	486,188	365,296	60,054	364,392	607,984	0	1830
Monocitos (%)	4,757	2,916	0,479	3,784	5,729	0	13
Eosinófilos/ μl	605,378	517,651	87,499	427,559	783,198	39	1988
Eosinófilos (%)	5,954	4,712	0,796	4,336	7,573	0,4	15,7
Basófilos/ μ	17,630	20,614	3,389	10,75	24,5	0	62
Basófilos (%)	0,180	0,223	0,037	0,1	0,25	0	1

Tabla 33: Resultados de la bioquímica sanguínea básica de los perros con EMC del estudio

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Glucosa (mg/dl)	90,740	56,565	9,561	71,310	110,170	23	379
Urea (mg/dl)	25,583	15,501	2,583	20,338	30,828	7,7	70,9
Creatinina (mg/dl)	0,874	0,3018	0,051	0,768	0,979	0,4	2,0
GPT (U/l)	53,750	103,232	17,205	18,820	88,680	10	639

El estudio electroforético de las proteínas de los 37 perros con EMC incluidos en el estudio ofreció el siguiente resultado (tabla 34):

Tabla 34: Resultados del proteinograma de la población de perros con EMC del estudio

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Proteínas totales (g/dl)	7,275	1,229	0,204	6,859	7,691	5,50	11,0
Albúmina (%)	39,758	10,000	1,796	36,090	43,426	17,60	59,50
Albúmina (g/dl)	2,818	0,544	0,097	2,618	3,018	1,50	3,90
Globulinas (g/dl)	4,490	1,471	0,264	3,950	5,020	3	9
α1-globulinas (%)	3,872	1,452	0,260	3,339	4,404	1,70	8,50
α1-globulinas (g/dl)	0,270	0,096	0,017	0,235	0,305	0,14	0,68
α2-globulinas (%)	8,520	2,953	0,530	7,437	9,603	2,90	17,20
α2-globulinas (g/dl)	0,601	0,189	0,034	0,532	0,671	0,31	1,16
β-globulinas (%)	25,837	6,375	1,145	23,499	28,176	11,6	38,90
β-globulinas (g/dl)	1,846	0,424	0,076	1,6906	2,002	1,07	2,99
γ-globulinas (%)	22,009	14,807	2,659	16,578	27,440	7,20	61,40
γ-globulinas (g/dl)	1,751	1,549	0,278	1,1837	2,320	0,48	6,20
Cociente A/G	0,702	0,293	0,052	0,5951	0,8101	0,21	1,47

5.3.2.2. Inmunofenotipo

Los resultados obtenidos en el estudio inmunofenotípico de la población de perros con EMC incluidos en nuestro estudio se han reflejado en las tablas 35A y 35B.

Tabla 35: Valores obtenidos en la población de perros con EMC para las diferentes subpoblaciones linfocitarias. **A:** valores porcentuales de las subpoblaciones linfocitarias y cociente CD4/CD8. **B:** Valores absolutos en función del número de linfocitos/ μl en la muestra.

A:	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
% de linfocitos T (CD3+)	72,218	9,049	1,575	69,009	75,427	56,790	91,320
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	32,915	9,441	1,596	29,671	36,158	12,20	48,60
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	27,988	17,286	2,922	22,050	33,926	4,64	83,43
% de linfocitos B (CD21+)	14,058	7,852	1,327	11,361	16,756	1,16	35,08
% de linfocitos CMHII+	91,906	5,197	0,891	90,092	93,719	77,15	98,85
% de linfocitos CD3-CD21-	14,9071	14,634	2,509	9,800	20,013	1,71	70,87
Cociente CD4/CD8	1,827	1,776	0,300	1,217	2,438	0,14	10,46

B:	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Linfocitos T (CD3+)/ μl	2139,391	1379,878	240,206	1650,107	2628,674	289,390	6856,730
Linfocitos Th (CD3+CD4+)/ μl	1006,826	919,786	155,472	690,868	1322,784	132,260	5668,620
Linfocitos Tc (CD3+CD8+)/ μl	1117,546	1450,164	245,122	619,397	1615,695	50,000	6264,090
Linfocitos B (CD21+)/ μl	355,417	239,291	40,447	273,217	437,617	26,000	1206,500
Linfocitos CMHII+/ μl	2971,204	2537,878	435,242	2085,696	3856,711	370,320	14353,34
Linfocitos CD3-CD21-/ μl	309,756	197,240	33,826	240,935	378,577	1,150	868,940

5.3.2.3. Concentración plasmática de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α

Al igual que en el caso de los perros sanos, no pudo llevarse a cabo la medición de la concentración de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 en la totalidad de los perros con EMC del estudio. Por ello, en la tabla 36 se muestran los resultados obtenidos mediante ELISA de las concentraciones plasmáticas de dichas citocinas especificando el número de perros (N) en el que se ha podido hallar cada valor.

Tabla 36: Valores de la concentración de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α en la población de perros con EMC del estudio

	Media	N	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Concentración IFN- γ (pg/ml)	95,51	34	223,907	38,399	17,387	173,635	0	1119,18
Concentración IL-6 (pg/ml)	36,019	31	41,344	7,425	20,854	51,184	0	191,929
Concentración IL-10 (pg/ml)	19,96	32	68,868	12,174	0	44,79	0	370
Concentración TNF- α (pg/ml)	24,275	34	51,935	8,906	6,154	42,397	0	215,374

5.3.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA FASE DE LA EMC SOBRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LA POBLACIÓN DE PERROS CON EMC

En un intento de buscar la existencia de relaciones estadísticamente significativas entre la existencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad y las diferentes variables analizadas, se llevó a cabo un estudio estadístico comparativo a partir de los resultados de los perros con EMC de nuestro estudio según su fase (subclínica o clínica).

Así, se ha observado que existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre los perros con EMC en fase subclínica y clínica para los valores de glóbulos rojos/ μ l ($p=0,000$), hemoglobina ($p=0,001$), hematocrito ($p=0,000$), valores absolutos y relativos de eosinófilos ($p=0,002$ y $p=0,002$, respectivamente), porcentaje y valor absoluto de albúmina plasmática ($p=0,000$ y $p=0,001$ respectivamente), globulinas/dl ($p=0,028$), porcentaje de α 1-globulinas ($p=0,040$), porcentaje de α 2-globulinas ($p=0,025$), porcentaje y valor absoluto de γ -globulinas ($p=0,033$ y $p=0,048$,

respectivamente) y cociente albúmina/globulinas ($p=0,001$). En cambio, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre los perros con EMC en fase subclínica y en fase clínica para las demás variables analizadas, incluidos los parámetros del inmunofenotipo y la concentración de citocinas. Sin embargo, en este sentido cabe destacar que, a pesar de no haberse alcanzado la significación estadística para un intervalo de confianza del 95%, tanto el valor relativo como el valor absoluto de los linfocitos B sanguíneos son inferiores en los animales con sintomatología clínica de la enfermedad que en los animales en la fase asintomática. En las tablas 37-41 se han reflejado los valores de las variables estudiadas para los perros con EMC en fase clínica y en fase subclínica, indicando el valor de la p resultante de la comparación entre las subpoblaciones de perros afectados por esta enfermedad. En los casos en los que se han hallado diferencias estadísticamente significativas, este valor aparece resaltado en color rojo.

Tabla 37: Resultados de la hematología sanguínea en perros con EMC en función de la fase de la enfermedad, para un nivel de confianza del 95%. **A:** resultados de las series eritroide. **B:** resultados de la serie plaquetar. **C:** resultados de la serie leucocitaria.

A:	Fase de EMC	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Valor de p
Glóbulos rojos $\times 10^6/\mu\text{l}$	Clínica	5,07	1,13	0,399	0,000
	Subclínica	6,755	1,0185	0,189	
Hemoglobina (g/dl)	Clínica	11,65	3,086	1,091	0,001
	Subclínica	15,44	2,295	0,426	
Hematocrito (%)	Clínica	36,5	10,124	3,579	0,000
	Subclínica	48,407	7,052	1,309	
V.C.M. (fl)	Clínica	71,45	6,93	2,45	0,852
	Subclínica	71,903	5,776	1,072	
H.C.M. (pg)	Clínica	22,838	1,599	0,565	0,932
	Subclínica	22,886	1,383	0,256	
C.H.C.M. (g/dl)	Clínica	32,15	3,154	1,115	0,851
	Subclínica	31,96	2,424	0,45	

B:	Fase de EMC	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Valor de p
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{l}$	Clínica	160,63	129,061	45,63	0,595
	Subclínica	182,38	90,691	17,786	

C:	Fase de EMC	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Valor de p
Leucocitos x10 ³ /μl	Clínica	10,721	6,123	2,164	0,948
	Subclínica	10,549	6,688	1,242	
Neutrófilos/μl	Clínica	5367,832	2911,338	1029,313	0,598
	Subclínica	6508,659	5814,746	1079,771	
Neutrófilos (%)	Clínica	56,438	19,256	6,808	0,533
	Subclínica	60,224	13,826	2,567	
Linfocitos/μl	Clínica	4167,006	4858,914	1717,885	0,437
	Subclínica	2740,18	1317,817	244,712	
Linfocitos (%)	Clínica	32,688	22,518	7,961	0,604
	Subclínica	28,252	10,886	2,021	
Monocitos/μl	Clínica	641,56	498,609	176,285	0,178
	Subclínica	443,327	317,197	58,902	
Monocitos (%)	Clínica	6,45	2,862	1,011	0,063
	Subclínica	4,29	2,801	0,52	
Eosinófilos/μl	Clínica	245,66	219,104	82,813	0,002
	Subclínica	695,308	533,697	100,859	
Eosinófilos (%)	Clínica	2,286	2,344	0,886	0,002
	Subclínica	6,871	4,73	0,894	
Basófilos/μl	Clínica	10,11	15,525	5,489	0,178
	Subclínica	19,7	21,575	4,006	
Basófilos (%)	Clínica	0,09	0,125	0,044	0,085
	Subclínica	0,2	0,239	0,044	

Tabla 38: Resultados de la bioquímica sanguínea básica en perros con EMC en función de la fase de la enfermedad

	Fase de EMC	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Valor de p
Glucosa (mg/dl)	Clínica	97,17	28,252	11,534	0,765
	Subclínica	89,41	61,09	11,344	
Urea (mg/dl)	Clínica	26,043	19,515	7,376	0,932
	Subclínica	25,472	14,788	2,746	
Creatinina (mg/dl)	Clínica	0,829	0,236	0,089	0,665
	Subclínica	0,885	0,319	0,061	
GPT (U/l)	Clínica	117,14	230,669	87,185	0,402
	Subclínica	38,45	25,927	4,814	

Tabla 39: Resultados del proteinograma en perros con EMC en función de la fase de la enfermedad

	Fase de EMC	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Valor de p
Proteínas totales (g/dl)	Clínica	8,143	1,893	0,715	0,189
	Subclínica	7,066	0,942	0,174	
Albúmina (%)	Clínica	24,986	6,499	2,906	0,000
	Subclínica	42,598	7,823	1,534	
Albúmina (g/dl)	Clínica	2,128	0,355	0,159	0,001
	Subclínica	2,951	0,471	0,092	
Globulinas (g/dl)	Clínica	6,67	1,763	0,788	0,028
	Subclínica	4,06	0,98	0,192	
α 1-globulinas (%)	Clínica	2,664	1,012	0,452	0,040
	Subclínica	4,104	1,421	0,278	
α 1-globulinas (g/dl)	Clínica	0,22	0,051	0,023	0,207
	Subclínica	0,28	0,1	0,019	
α 2-globulinas (%)	Clínica	5,86	2,082	0,931	0,025
	Subclínica	9,032	2,843	0,557	
α 2-globulinas (g/dl)	Clínica	0,488	0,131	0,058	0,145
	Subclínica	0,623	0,193	0,037	
β -globulinas (%)	Clínica	23,226	9,282	4,151	0,326
	Subclínica	26,34	5,776	1,132	
β -globulinas (g/dl)	Clínica	1,942	0,486	0,217	0,592
	Subclínica	1,828	0,42	0,082	
γ -globulinas (%)	Clínica	43,228	18,132	8,109	0,033
	Subclínica	17,928	10,155	1,991	
γ -globulinas (g/dl)	Clínica	4,006	2,149	0,961	0,048
	Subclínica	1,318	0,963	0,189	
Cociente A/G	Clínica	0,338	0,118	0,053	0,001
	Subclínica	0,772	0,262	0,051	

Tabla 40: Resultados del inmunofenotipo en sangre periférica en perros con EMC en función de la fase de la enfermedad, para un nivel de confianza del 95%. **A:** resultados porcentuales del inmunofenotipo y cociente CD4/CD8. **B:** resultados absolutos del inmunofenotipo.

A:	Fase de EMC	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Valor de p
% de linfocitos T (CD3+)	Clínica	73,278	12,54	5,119	0,757
	Subclínica	71,983	8,38	1,612	
% de linfocitos Th (CD3+CD4+)	Clínica	29,087	13,219	4,996	0,390
	Subclínica	33,871	8,287	1,566	
% de linfocitos Tc (CD3+CD8+)	Clínica	30,268	25,777	9,743	0,703
	Subclínica	27,418	15,065	2,847	
% de linfocitos B (CD21+)	Clínica	10,437	10,872	3,843	0,140
	Subclínica	15,131	6,6	1,27	
% de linfocitos CMH II+	Clínica	91,411	5,748	2,032	0,763
	Subclínica	92,058	5,128	1,005	
% de linfocitos CD3-CD21-	Clínica	28,13	26,35	9,959	0,147
	Subclínica	11,478	7,233	1,392	
Cociente CD4/CD8	Clínica	2,412	3,603	1,362	0,613
	Subclínica	1,681	0,988	0,186	

B:	Fase de EMC	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Valor de p
Linfocitos T (CD3+)/ μ l	Clínica	2332,911	2277,642	929,843	0,71
	Subclínica	2096,386	1155,541	222,384	
Linfocitos Th (CD3+CD4+)/ μ l	Clínica	1323,607	1934,914	731,328	0,610
	Subclínica	927,631	448,157	84,693	
Linfocitos Tc (CD3+CD8+)/ μ l	Clínica	1985,397	2772,097	1047,754	0,344
	Subclínica	900,583	834,529	157,711	
Linfocitos B (CD21+)/ μ l	Clínica	251,34	221,94	78,467	0,165
	Subclínica	386,255	239,368	46,066	
Linfocitos CMH II+/ μ l	Clínica	3993,14	4685,838	1656,694	0,451
	Subclínica	2656,762	1384,516	271,526	
Linfocitos CD3-CD21-/ μ l	Clínica	377,811	194,45	73,495	0,313
	Subclínica	292,112	197,692	38,045	

Tabla 41: Concentración plasmática de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α en perros con EMC en función de la fase de la enfermedad, para un nivel de confianza del 95%.

	Fase de EMC	Media	Desviación típica	Error típico de la media	Valor de p
IFN- γ (pg/ml)	Clínica	56,175	72,286	27,321	0,610
	Subclínica	105,708	248,801	47,881	
IL-6 (pg/ml)	Clínica	12,488	11,068	4,518	0,122
	Subclínica	41,667	44,039	8,807	
IL-10 (pg/ml)	Clínica	54,05	139,468	52,714	0,441
	Subclínica	10,42	28,8	5,76	
TNF- α (pg/ml)	Clínica	32,671	80,027	32,671	0,669
	Subclínica	22,476	45,735	8,643	

5.4. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE PERROS SIN EMC Y CON DIFERENTES PATOLOGÍAS

Un total de **83 perros** atendidos por **diversas enfermedades** diferentes a la EMC han sido incluidos en este estudio y constituyen el Grupo 3, como se describió previamente.

5.4.1. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS SIN EMC PERO CON OTRAS PATOLOGÍAS

5.4.1.1. Distribución en función del tipo de patología

Como se describió en el apartado de Materiales y Métodos, siguiendo los criterios de inclusión establecidos, los 83 perros incluidos en el Grupo 3 de este estudio fueron considerados negativos frente a ehrlichiosis y leishmaniosis caninas mediante IFI y PCR y, en cambio, presentaban sintomatología clínica y/o alteraciones laboratoriales compatibles con otras enfermedades. Dichas enfermedades fueron agrupadas, para facilitar su estudio, en enfermedades mucocutáneas, cuando se trataba de patologías oftalmológicas, dermatológicas o de afectación de la cavidad oral, enfermedades oncológicas,

enfermedades digestivas y enfermedades traumatológicas. La distribución de los 83 animales en función de estas patologías ha quedado reflejada en la tabla 42.

Tabla 42: Distribución de los 83 perros del Grupo 3 en función de la patología que padecían

Tipo de patología	Número de animales	Porcentaje de animales
Digestiva	20	24,09
Oncológica	28	33,73
Mucocutánea	18	21,68
Traumatológica	17	20,48

Debido a que el objetivo inicial de este trabajo no era el estudio de ninguna patología digestiva, oncológica, traumatológica o mucocutánea en concreto y que sólo se ha empleado su caracterización para tratar de comparar las diferentes variables estudiadas entre los perros con EMC y con otras patologías, con las que a menudo puede asociarse, no se ha hecho una clasificación más concreta de patologías, agrupándose en las citadas 4 categorías.

En este sentido, cabe destacar que entre las patologías clasificadas como “digestivas” la amplísima mayoría eran casos de enfermedad inflamatoria crónica intestinal.

Bajo el término de patologías “mucocutáneas” se han englobado, en su mayoría, enfermedades con un componente inflamatorio de afectación dermatológica, oftalmológica o periodontal.

Entre los 17 casos clínicos de patologías “traumatológicas” se han incluido principalmente cuadros de displasias, fracturas, luxaciones y enfermedades degenerativas de diverso origen.

De los 28 casos incluidos en el estudio con patologías “oncológicas”, se han incluido principalmente casos de tumores de mama, siendo el resto en su mayoría casos de masas aisladas en diferentes localizaciones. En cuanto a la malignidad de estos casos, 18 fueron considerados tumores malignos en base a sus características histopatológicas, mientras que las biopsias de los restantes 10 casos oncológicos mostraron que se trataba de tumores benignos.

5.4.1.2. Distribución en función del sexo

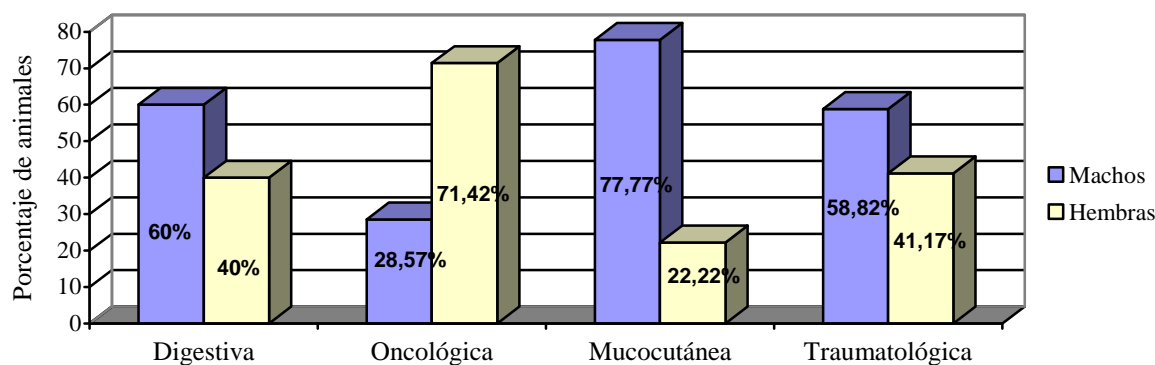
Del total de perros incluidos en el Grupo 3 del estudio, 44 eran machos y 39 hembras (Tabla 43).

Tabla 43: Distribución de los 83 animales del Grupo 3 del estudio en función del sexo

Sexo	Número de animales	Porcentaje
Macho	44	53,01
Hembra	39	46,98

En el gráfico 8 puede observarse la distribución en función del sexo de los animales incluidos en cada uno de los grupos de patologías. De los perros con patologías digestivas, 8 eran hembras (40%) y 12 machos (60%). Entre los 28 perros con patologías oncológicas, 20 eran hembras (71,42%) y 8 machos (28,57%). En la categoría de enfermedades mucocutáneas, 4 de los 18 perros incluidos eran hembras (22,22%) y 14 machos (77,77%). Finalmente, entre los 17 perros con patologías traumatológicas, 7 eran hembras (41,17%) y 10 machos (58,82%).

Gráfico 8: Distribución en función del sexo de los perros incluidos en cada uno de los subgrupos de patologías del Grupo 3 del estudio



5.4.1.3. Distribución en función de la edad

Los 83 perros incluidos en el Grupo 3 del estudio fueron clasificados, al igual que en las poblaciones ya descritas, en 4 grupos según su edad: cachorros (aquellos animales

que tenían menos de 1 año al inicio del estudio); jóvenes (animales de más de 1 año hasta 3,5 años); adultos (de 4 a 8 años); y geriátricos (mayores de 8 años). En la tabla 44 puede observarse la distribución que siguen los 83 animales de este grupo en función de su edad.

Tabla 44: Distribución de los perros con patologías diferentes de la EMC en función de la edad

Grupo de edad	Número de perros	Porcentaje
Cachorro	13	15,66
Joven	11	13,25
Adulto	21	25,30
Geriátrico	38	45,78

La edad media de estos perros es de 6,83 años, siendo el mínimo de 4 meses y el máximo de 14 años.

En la Tabla 45 puede observarse la distribución de los animales de esta población en función de la patología y del grupo de edad al que pertenecían.

Tabla 45: Distribución en función de la edad de los perros incluidos en los grupos de patologías digestivas, oncológicas, mucocutáneas y traumatológicas

	Cachorro	Joven	Adulto	Geriátrico
Digestiva	4	5	5	6
Oncológica	0	1	4	23
Mucocutánea	3	1	7	7
Traumatológica	6	4	5	2

5.4.1.4. Distribución en función de la raza

Los perros del Grupo 3 mostraron una distribución en cuanto a la raza muy heterogénea, estando representadas en esta población un total de 28 razas (tabla 46).

Tabla 46: Distribución de los perros del Grupo 3 del estudio en función de la raza

Raza	Número de perros
Alaskan Malamute	1
Beagle	1
Bobtail	1
Boxer	5
Braco Alemán	1
Bulldog Francés	1
Bulldog Inglés	4
Cairn Terrier	1
Caniche	1
Chow Chow	2
Cocker Spaniel Americano	2
Cocker Spaniel Inglés	7
Dálmata	2
Doberman	1
Fox Terrier	1
Golden Retriever	3
Husky Siberiano	3
Labrador Retriever	3
Lakeland Terrier	1
Bichón Maltés	2
Mestizo	20
Pastor Alemán	6
Rottweiler	1
Schnauzer miniatura	1
Shar Pei	2
Spaniel Bretón	1
West Highland White Terrier	6
Yorkshire Terrier	3

5.4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE PERROS SIN EMC PERO CON OTRAS PATOLOGÍAS

Al igual que lo descrito para las poblaciones de perros sanos y con EMC de este estudio, a partir de las muestras de sangre de los 83 perros incluidos en el Grupo 3, o perros con patologías diferentes a la EMC, se realizaron hematología y bioquímica básicas, proteinograma e inmunofenotipaje mediante citometría de flujo. En estos animales no fue posible determinar la concentración plasmática de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α .

En estos 83 perros los resultados tanto serológicos como moleculares frente a *E. canis* y *L. infantum* fueron negativos, descartándose, por tanto, la EMC y la leishmaniosis canina en ellos, lo que permitió su inclusión en el Grupo 3 del estudio, siguiendo los criterios establecidos en el apartado 4.3.4. de la presente tesis doctoral.

Los resultados obtenidos para el resto de variables analizadas a partir de las muestras sanguíneas de estos perros serán descritos a continuación en función del tipo de patología de cada animal en concreto y se compararán con los obtenidos en los animales sanos y en los animales con EMC.

5.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS ENTRE LAS POBLACIONES DE PERROS SANOS, CON EMC Y CON OTRAS PATOLOGÍAS

Con el fin de conocer la posible existencia de diferencias en los resultados encontrados para las variables analizadas en cada una de las poblaciones de perros (sanos, con EMC y con diversas patologías digestivas, mucocutáneas, oncológicas o traumáticas) se realizó un estudio comparativo de los mismos, empleando para ello un análisis de varianza (ANOVA) y, en caso de hallarse diferencias significativas entre los grupos, un test de Bonferroni, que permite realizar comparaciones de múltiples medias y, así, determinar entre qué grupos de patologías en concreto se encuentran las diferencias estadísticas para cada parámetro biopatológico.

En las siguientes tablas (tablas 47-54) pueden observarse los resultados de cada variable en cada grupo, así como el valor de la p obtenido en la comparación de los grupos para cada variable. En los casos en los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$), el valor de la p se ha remarcado en color rojo.

Como se ha mencionado previamente, en el grupo de perros con patologías digestivas, mucocutáneas, oncológicas y traumatológicas (Grupo 3) no fue posible realizar la determinación de la concentración de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α , por lo que el estudio comparativo sólo ha podido realizarse para las poblaciones de perros sanos y de perros con EMC.

Tabla 47: Comparación de los valores de la serie roja de la hematología entre las poblaciones de perros con patologías digestivas, patologías mucocutáneas, patologías oncológicas, patologías traumatológicas, EMC y perros sanos.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
Glóbulos rojos x10 ⁶ /µl	Digestiva	8,547	7,858	1,852	4,639	12,455	5,51	39,9	0,119
	Mucocutánea	6,976	0,844	0,199	6,556	7,396	5,57	8,9	
	Oncológica	6,568	1,041	0,2	6,157	6,98	4,36	8,42	
	Traumática	7,213	0,708	0,171	6,849	7,577	4,98	7,93	
	Ehrlichiosis	6,391	1,245	0,204	5,975	6,806	4,00	9,32	
	Sano	7,355	0,829	0,122	7,109	7,602	5,89	8,79	
Hemoglobina (g/dl)	Digestiva	15,97	1,703	0,401	15,12	16,81	13,00	18,00	0,000
	Mucocutánea	16,49	1,772	0,418	15,61	17,38	14,00	21,00	
	Oncológica	15,43	2,28	0,431	14,54	16,31	11,00	21,00	
	Traumática	17,09	1,821	0,442	16,16	18,03	12,00	20,00	
	Ehrlichiosis	14,62	2,906	0,478	13,65	15,59	8,00	21,00	
	Sano	17,58	2,166	0,323	16,93	18,24	14,00	22,00	
Hematocrito (%)	Digestiva	45,478	4,869	1,147	43,056	47,899	36,90	51,50	0,000
	Mucocutánea	48,733	6,198	1,46	45,651	51,816	36,70	63,30	
	Oncológica	45,682	7,157	1,352	42,907	48,457	32,00	63,60	
	Traumática	49,982	4,997	1,212	47,413	52,552	36,00	57,40	
	Ehrlichiosis	45,833	9,127	1,50	42,789	48,876	24,00	62,60	
	Sano	52,404	5,74	0,855	50,68	54,129	40,90	64,00	
V.C.M. (fl)	Digestiva	68,689	3,954	0,932	66,722	70,655	62,90	80,50	0,051
	Mucocutánea	69,906	3,619	0,853	68,106	71,705	63,30	76,00	
	Oncológica	69,615	3,745	0,72	68,133	71,097	62,80	75,50	
	Traumática	69,371	3,472	0,842	67,585	71,156	62,60	74,40	
	Ehrlichiosis	71,805	5,943	0,977	69,824	73,787	60,00	81,50	
	Sano	71,028	2,232	0,329	70,365	71,691	67,00	75,00	
H.C.M. (pg)	Digestiva	24,144	1,293	0,304	23,501	24,788	21,70	26,50	0,001
	Mucocutánea	23,744	1,376	0,324	23,06	24,429	20,40	26,80	
	Oncológica	23,548	1,294	0,249	23,036	24,06	20,90	25,60	
	Traumática	23,876	1,106	0,268	23,308	24,445	22,20	25,90	
	Ehrlichiosis	22,876	1,409	0,231	22,406	23,346	19,80	26,20	
	Sano	23,898	0,82	0,125	23,645	24,15	22,40	25,60	
C.H.C.M. (g/dl)	Digestiva	35,16	1,253	0,295	34,54	35,78	33,00	37,00	0,000
	Mucocutánea	33,96	1,449	0,341	33,24	34,68	32,00	38,00	
	Oncológica	33,84	1,179	0,227	33,38	34,31	32,00	37,00	
	Traumática	34,48	1,929	0,468	33,49	35,47	32,00	38,00	
	Ehrlichiosis	32,00	2,552	0,42	31,15	32,85	29,00	38,00	
	Sano	33,55	1,205	0,178	33,20	33,91	31,00	36,00	

Como puede observarse en la tabla 47, se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de algunas de las variables de la serie roja en las diferentes poblaciones de perros incluidas en este estudio. El empleo del test de Bonferroni ha permitido establecer entre qué grupos de patologías en concreto se hallan diferencias estadísticas en cada caso.

Así, los perros con EMC y con patologías oncológicas presentan una concentración de hemoglobina (14,62 g/dl y 15,43 g/dl, respectivamente) menor que los perros sanos (17,58 g/dl) y que los perros con patologías traumatológicas (17,09 g/dl).

Del mismo modo, los perros de la población sana muestran un hematocrito mayor (52,40%) que los perros con patologías digestivas (45,47%), oncológicas (45,68%) y EMC (45,83%).

Además, los perros con EMC presentan menores valores de H.C.M. (22,87 pg) que los perros con patologías digestivas (24,14 pg) y que los perros sanos (23,89 pg). Asimismo, los perros con EMC presentan un menor valor de CHCM (32 g/dl) que los demás grupos de perros del estudio.

Tabla 48: Resultados del recuento plaquetar en los perros del estudio en función del tipo de patología que padecían.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{l}$	Digestiva	366,63	140,852	35,213	291,57	441,68	90	732	0,000
	Mucocutánea	308,11	89,287	21,045	263,71	352,51	188	505	
	Oncológica	364,12	154,331	30,866	300,42	427,82	214	843	
	Traumática	277,47	77,986	20,136	234,28	320,65	117	398	
	Ehrlichiosis	169,03	88,218	15,64	137,749	200,311	5	433	
	Sano	246,47	75,667	11,539	223,18	269,75	132	415	

Como puede observarse en la tabla 48, se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el recuento plaquetario entre los diferentes grupos caninos estudiados.

En concreto, los perros con EMC presentan un menor valor del recuento de esta población celular que los demás grupos, mientras que los perros con patologías digestivas,

oncológicas y mucocutáneas presentan un mayor valor de esta variable que los restantes grupos de perros.

Tabla 49: Resultados del estudio comparativo de la serie blanca entre las poblaciones de perros con patologías digestivas, mucocutáneas, oncológicas y traumatológicas, perros con EMC y perros sanos.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
Glóbulos blancos $\times 10^3/\mu\text{l}$	Digestiva	10,125	4,085	0,962	8,094	12,157	5,7	19,3	0,562
	Mucocutánea	11,372	3,704	0,873	9,529	13,214	6,73	22,5	
	Oncológica	9,743	3,457	0,653	8,402	11,083	3,3	18,09	
	Traumática	9,101	2,135	0,518	8,003	10,199	5,6	13,91	
	Ehrlichiosis	10,586	6,487	1,066	8,423	12,749	3,9	43,05	
	Sano	9,578	2,869	0,432	8,705	10,45	3,81	16,76	
Neutrófilos $/\mu\text{l}$	Digestiva	7407,56	3664,273	888,71	5523,56	9291,561	2829	14723,2	0,278
	Mucocutánea	7367,35	3089,482	728,198	5830,99	8903,718	4071,65	16987,5	
	Oncológica	7167,71	3103,403	586,488	5964,34	8371,091	3168	14761,4	
	Traumática	6435,38	2065,528	500,964	5373,38	7497,377	3864	10418,5	
	Ehrlichiosis	6261,99	5307,771	872,592	4492,29	8031,693	2808	35860,6	
	Sano	5612,36	1876,994	282,967	5041,7	6183,021	2355,28	10055,7	
Neutrófilos (%)	Digestiva	71,871	14,111	3,422	64,615	79,126	41	89	0,000
	Mucocutánea	63,822	8,394	1,978	59,648	67,997	46,5	79,1	
	Oncológica	72,986	10,637	2,01	68,861	77,11	53,1	96	
	Traumática	70,176	11,426	2,771	64,302	76,051	56,7	94	
	Ehrlichiosis	59,405	14,942	2,456	54,423	64,388	23,5	87	
	Sano	59,707	8,047	1,186	57,317	62,096	44,8	73,5	
Linfocitos $/\mu\text{l}$	Digestiva	2010,55	1397,962	329,502	1315,36	2705,742	594	5404	0,002
	Mucocutánea	2705,36	770,16	181,528	2322,37	3088,356	1377	4297,59	
	Oncológica	1766,71	799,998	151,185	1456,5	2076,919	99	4100	
	Traumática	1912,02	750,194	181,948	1526,31	2297,739	309	3103	
	Ehrlichiosis	3048,68	2509,175	412,505	2212,08	3885,284	480	14960,7	
	Sano	2839,46	955,313	140,853	2555,77	3123,161	941,07	4776	
Linfocitos (%)	Digestiva	20,265	13,06	3,167	13,55	26,98	7	55	0,000
	Mucocutánea	24,761	6,52	1,536	21,519	28,004	14,4	35,2	
	Oncológica	18,904	8,104	1,531	15,761	22,046	3	37,2	
	Traumática	20,5	8,669	2,102	16,043	24,957	3	35,1	
	Ehrlichiosis	29,211	13,936	2,291	24,564	33,857	8	72,1	
	Sano	29,223	7,264	1,059	27,09	31,356	16	42,5	

Monocitos / μ l	Digestiva	298,946	288,741	70,03	150,489	447,403	0	925,56	0,012
	Mucocutánea	539,877	310,69	73,23	385,375	694,38	0	1327,5	
	Oncológica	404,233	312,959	59,143	282,88	525,586	0	1230,12	
	Traumática	312,932	234,323	56,831	192,454	433,41	0	719,25	
	Ehrlichiosis	486,188	365,296	60,054	364,392	607,984	0	1830	
	Sano	538,572	224,065	33,036	472,033	605,111	208	1026,72	
Monocitos (%)	Digestiva	2,959	2,573	0,624	1,636	4,282	0	9	0,005
	Mucocutánea	4,828	2,44	0,575	3,614	6,041	0	9,5	
	Oncológica	3,957	2,282	0,431	3,072	4,842	0	8	
	Traumática	3,371	2,518	0,61	2,076	4,665	0	7,5	
	Ehrlichiosis	4,757	2,916	0,479	3,784	5,729	0	13	
	Sano	5,207	1,441	0,217	4,769	5,645	2,9	9,3	
Eosinófilos / μ l	Digestiva	382,047	386,443	93,726	183,356	580,738	0	1220	0,064
	Mucocutánea	727,952	765,839	180,509	347,109	1108,795	141	3492,06	
	Oncológica	387,067	373,219	71,826	239,427	534,708	0	1525,86	
	Traumática	372,841	315,344	76,482	210,706	534,977	0	1126,65	
	Ehrlichiosis	605,378	517,651	87,499	427,559	783,198	39	1988	
	Sano	459,41	346,175	52,791	352,873	565,947	22,36	1541,33	
Eosinófilos (%)	Digestiva	4,647	5,716	1,386	1,708	7,586	0	20	0,315
	Mucocutánea	6,194	5,434	1,28	3,492	8,897	2	24,2	
	Oncológica	3,87	3,786	0,728	2,373	5,368	0	14,7	
	Traumática	4,129	3,265	0,791	2,451	5,808	0	11,1	
	Ehrlichiosis	5,954	4,712	0,796	4,336	7,573	0,4	15,7	
	Sano	4,77	3,248	0,489	3,783	5,758	0,3	11,4	
Basófilos / μ l	Digestiva	12,71	35,629	8,641	0	31,03	0	138	0,003
	Mucocutánea	5,01	6,926	1,632	1,57	8,45	0	20	
	Oncológica	1,54	3,88	0,747	0,01	3,08	0	13	
	Traumática	6,08	7,916	1,92	2,01	10,15	0	25	
	Ehrlichiosis	17,63	20,614	3,389	10,75	24,5	0	62	
	Sano	11,07	9,234	1,347	8,36	13,78	0	37	
Basófilos (%)	Digestiva	0,18	0,527	0,128	0	0,45	0	2	0,027
	Mucocutánea	0,04	0,062	0,015	0,01	0,08	0	0	
	Oncológica	0,02	0,058	0,011	0	0,05	0	0	
	Traumática	0,06	0,086	0,021	0,02	0,11	0	0	
	Ehrlichiosis	0,18	0,223	0,037	0,1	0,25	0	1	
	Sano	0,11	0,083	0,012	0,08	0,13	0	0	

Entre los parámetros de la serie blanca analizados en la población canina estudiada, se han hallado algunas diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en función del tipo de patología.

En concreto, se ha observado que los perros con EMC y los perros sanos presentan un menor porcentaje de neutrófilos (59,40% y 59,70%, respectivamente) que los perros con patologías traumatológicas (70,17%), digestivas (71,87%) y oncológicas (72,98%).

En cuanto a la población linfocitaria, los perros con patologías oncológicas presentan menores valores porcentuales y absolutos de linfocitos (18,90% y 1766,71/ μ l, respectivamente) que los perros sanos (29,22% y 2839,468/ μ l, respectivamente) y los perros con EMC (29,21% y 3048,683/ μ l, respectivamente). Además, el porcentaje de linfocitos que presentan los perros sanos es también significativamente superior al de los perros con patologías traumatológicas (20,50%) y digestivas (20,26%). Por otra parte, se ha observado que en la población de perros estudiada, el porcentaje de monocitos es significativamente superior en los perros sanos (5,20%) que en los que padecen patologías digestivas (2,95%).

Tabla 50: Resultados de la bioquímica sanguínea básica en función del tipo de patología.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
Glucosa (mg/dl)	Digestiva	107,41	13,039	3,162	100,71	114,12	80	146	0,000
	Mucocutánea	99,28	13,787	3,25	92,42	106,13	66	116	
	Oncológica	99,69	11,331	2,222	95,12	104,27	60	112	
	Traumática	99,88	9,623	2,334	94,93	104,83	86	119	
	Ehrlichiosis	90,74	56,565	9,561	71,31	110,17	62	379	
	Sano	74,57	21,719	3,168	68,2	80,95	65	121	
Urea (mg/dl)	Digestiva	34,5	18,646	4,394	25,228	43,772	19	83	0,000
	Mucocutánea	33,594	8,762	2,065	29,237	37,952	19	47	
	Oncológica	41,433	21,018	4,045	33,119	49,748	16,5	105	
	Traumática	36,471	12,545	3,042	30,02	42,921	19	57	
	Ehrlichiosis	25,583	15,501	2,583	20,338	30,828	7,7	70,9	
	Sano	20,255	7,973	1,163	17,914	22,596	6,2	40	
Creatinina (mg/dl)	Digestiva	0,941	0,398	0,096	0,736	1,146	0,4	1,9	0,717
	Mucocutánea	0,9	0,224	0,053	0,788	1,012	0,5	1,4	
	Oncológica	0,829	0,276	0,052	0,722	0,936	0,4	1,4	
	Traumática	0,865	0,18	0,043	0,772	0,957	0,6	1,3	
	Ehrlichiosis	0,874	0,301	0,051	0,768	0,979	0,4	2	
	Sano	0,84	0,151	0,022	0,795	0,885	0,5	1,2	

GPT (U/l)	Digestiva	40,35	52,389	12,706	13,42	67,29	14	217	0,797
	Mucocutánea	38,22	40,514	9,549	18,08	58,37	9	159	
	Oncológica	41,75	29,719	5,616	30,23	53,27	15	134	
	Traumática	32	38,73	9,393	12,09	51,91	9	179	
	Ehrlichiosis	53,75	103,232	17,205	18,82	88,68	10	639	
	Sano	48,63	20,412	3,01	42,57	54,69	16	108	

Los resultados de la bioquímica sanguínea básica realizada a los perros del estudio mostrados en la tabla 50 revelan la existencia de unos valores de glucemia significativamente inferiores en los perros sanos (74,57 mg/dl) que en los perros con patologías digestivas (107,41 mg/dl) y oncológicas (99,69 mg/dl), así como un menor valor de urea en los perros sanos (20,25 mg/dl) que en los perros con patologías mucocutáneas (33,59 mg/dl), digestivas (34,5 mg/dl), traumatológicas (36,47 mg/dl), y oncológicas (41,43 mg/dl). Asimismo, los perros con EMC presentan un menor valor de urea (25,58 mg/dl) que los perros con patologías oncológicas.

Tabla 51: Valores del proteinograma en las diferentes poblaciones estudiadas en función de la patología

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
Proteínas totales (g/dl)	Digestiva	6,400	1,149	0,271	5,828	6,972	3,6	8,2	0,000
	Mucocutánea	6,683	0,8	0,188	6,285	7,081	5,5	8,4	
	Oncológica	6,954	1,149	0,217	6,508	7,399	5	11,8	
	Traumática	6,365	0,655	0,159	6,028	6,702	5,1	7,6	
	Ehrlichiosis	7,275	1,229	0,204	6,859	7,691	5,5	11	
	Sano	6,194	0,64	0,093	6,006	6,382	5,2	8	
Albúmina (%)	Digestiva	51,880	1,474	0,737	49,534	54,226	49,8	53,1	0,000
	Mucocutánea	47,964	6,346	1,586	44,582	51,346	33,4	53,6	
	Oncológica	47,345	5,872	1,77	43,4	51,291	32,1	53,6	
	Traumática	52,344	3,161	1,053	49,91	54,775	48,6	56,1	
	Ehrlichiosis	39,758	10	1,796	36,09	43,426	17,6	59,5	
	Sano	53,578	4,581	0,683	52,201	54,954	43	62,1	
Albúmina (g/dl)	Digestiva	2,544	0,692	0,309	1,685	3,403	1,4	3	0,000
	Mucocutánea	3,109	0,271	0,067	2,964	3,253	2,7	3,7	
	Oncológica	3,075	0,414	0,125	2,797	3,354	2	3,6	
	Traumática	3,231	0,259	0,086	3,032	3,431	2,8	3,5	
	Ehrlichiosis	2,818	0,544	0,097	2,618	3,018	1,5	3,9	
	Sano	3,276	0,285	0,042	3,19	3,362	2,7	3,7	

Globulinas (g/dl)	Digestiva	2,640	0,399	0,2	2	3,27	2	3	0,000
	Mucocutánea	3,450	0,842	0,21	3,01	3,9	3	6	
	Oncológica	3,430	0,486	0,147	3,11	3,76	3	4	
	Traumática	2,960	0,418	0,139	2,64	3,28	2	4	
	Ehrlichiosis	4,490	1,471	0,264	3,95	5,02	3	9	
	Sano	2,850	0,474	0,071	2,71	3	2	4	
α1-globulinas (%)	Digestiva	5,300	0,781	0,45	3,36	7,24	4,4	5,8	0,015
	Mucocutánea	4,073	0,777	0,194	3,658	4,487	2,6	5,3	
	Oncológica	4,282	0,56	0,168	3,906	4,658	3,1	5,1	
	Traumática	4,644	0,403	0,134	4,334	4,955	4	5,3	
	Ehrlichiosis	3,872	1,452	0,26	3,339	4,404	1,7	8,5	
	Sano	4,584	0,74	0,113	4,355	4,813	3,3	6,4	
α1-globulinas (g/dl)	Digestiva	0,283	0,049	0,028	0,1608	0,405	0,25	0,34	0,885
	Mucocutánea	0,261	0,041	0,01	0,2389	0,283	0,18	0,36	
	Oncológica	0,282	0,059	0,017	0,2426	0,322	0,2	0,43	
	Traumática	0,282	0,025	0,008	0,2623	0,302	0,25	0,33	
	Ehrlichiosis	0,270	0,096	0,017	0,235	0,305	0,14	0,68	
	Sano	0,281	0,04	0,006	0,2691	0,293	0,19	0,35	
α2-globulinas (%)	Digestiva	8,967	1,171	0,676	6,056	11,878	8,1	10,3	0,000
	Mucocutánea	10,978	2,82	0,705	9,475	12,48	6,7	17,8	
	Oncológica	10,691	3,229	0,973	8,521	12,86	6	17,8	
	Traumática	9,267	1,251	0,417	8,305	10,228	6,9	10,8	
	Ehrlichiosis	8,520	2,953	0,53	7,437	9,603	2,9	17,2	
	Sano	12,610	2,485	0,37	11,865	13,358	7,9	17,4	
α2-globulinas (g/dl)	Digestiva	0,476	0,028	0,0166	0,405	0,548	0,46	0,51	0,001
	Mucocutánea	0,718	0,211	0,052	0,6058	0,831	0,39	1,21	
	Oncológica	0,686	0,197	0,059	0,5539	0,818	0,43	1,12	
	Traumática	0,568	0,094	0,031	0,4961	0,641	0,43	0,75	
	Ehrlichiosis	0,601	0,189	0,034	0,5324	0,671	0,31	1,16	
	Sano	0,771	0,186	0,028	0,715	0,828	0,41	1,11	
β-globulinas (%)	Digestiva	26,700	1,113	0,642	23,934	29,466	25,7	27,9	0,000
	Mucocutánea	26,606	3,953	0,988	24,499	28,712	20,2	35,4	
	Oncológica	27,382	3,923	1,183	24,746	30,018	22,3	37	
	Traumática	25,756	2,374	0,791	23,93	27,581	23,4	30	
	Ehrlichiosis	25,837	6,375	1,145	23,499	28,176	11,6	38,9	
	Sano	21,908	3,25	0,479	20,943	22,874	16,6	29,7	

β-globulinas (g/dl)	Digestiva	1,460	0,281	0,162	0,7605	2,159	1,15	1,7	0,000
	Mucocutánea	1,760	0,436	0,109	1,5281	1,993	1,21	2,79	
	Oncológica	1,782	0,296	0,089	1,5836	1,981	1,36	2,33	
	Traumática	1,595	0,226	0,075	1,4213	1,769	1,22	1,87	
	Ehrlichiosis	1,846	0,424	0,076	1,6906	2,002	1,07	2,99	
	Sano	1,332	0,241	0,036	1,2601	1,405	0,95	1,84	
γ-globulinas (%)	Digestiva	7,433	2,01	1,16	2,438	12,428	5,2	9,1	0,000
	Mucocutánea	10,374	4,479	1,119	7,988	12,761	7,3	25,8	
	Oncológica	10,318	3,414	1,029	8,025	12,612	6,1	16,5	
	Traumática	7,967	1,99	0,663	6,437	9,496	5,7	11,2	
	Ehrlichiosis	22,009	14,807	2,659	16,578	27,44	7,2	61,4	
	Sano	7,325	2,213	0,333	6,652	7,997	3,8	12,4	
γ-globulinas (g/dl)	Digestiva	0,410	0,157	0,09	0,0196	0,8	0,23	0,52	0,000
	Mucocutánea	0,701	0,424	0,106	0,4749	0,927	0,47	2,17	
	Oncológica	0,674	0,255	0,077	0,5028	0,846	0,35	1,13	
	Traumática	0,498	0,162	0,054	0,3741	0,623	0,29	0,76	
	Ehrlichiosis	1,751	1,549	0,278	1,1837	2,32	0,48	6,2	
	Sano	0,472	0,183	0,027	0,418	0,527	0,22	1,02	
Cociente Albúmina /Globulinas	Digestiva	1,072	0,057	0,028	0,9812	1,163	0,99	1,12	0,000
	Mucocutánea	0,940	0,206	0,051	0,8307	1,05	0,5	1,15	
	Oncológica	0,911	0,184	0,055	0,7882	1,035	0,47	1,15	
	Traumática	1,101	0,138	0,046	0,9943	1,207	0,94	1,27	
	Ehrlichiosis	0,702	0,293	0,052	0,5951	0,81	0,21	1,47	
	Sano	1,162	0,201	0,03	1,1009	1,223	0,75	1,54	

El estudio electroforético de las proteínas mostró resultados divergentes en los perros estudiados en función del tipo de patología que padecían.

Como puede observarse en la tabla 51 los perros con EMC estudiados presentaban una mayor concentración de proteínas totales en plasma (7,27 g/dl) que los perros con patologías digestivas (6,4 g/dl) y traumatológicas (6,36 g/dl) y que los perros sanos (6,19 g/dl). Asimismo, los perros con patologías oncológicas presentaban un mayor valor de proteínas totales (6,95 g/dl) que los perros sanos.

Los perros con EMC presentaban un menor porcentaje de albúmina (39,75%) que los demás perros del estudio (51,88% en los perros con patologías gastrointestinales, 47,96% en los perros con patologías mucocutáneas, 47,34% en los perros con patologías

oncológicas, 52,34% en los perros con patologías traumatológicas y 53,57% en los perros sanos). El valor absoluto de albúmina es también inferior en los perros con EMC (2,81 g/dl), así como en los perros con patologías digestivas (2,54 g/dl), que en los perros sanos (3,27 g/dl).

El valor absoluto de las globulinas parece estar relacionado estadísticamente con la infección por *E. canis* en el perro, mostrando los perros con EMC un mayor valor de globulinas (4,49 g/dl) que los perros con patologías digestivas (2,64 g/dl), mucocutáneas (3,45 g/dl), oncológicas (3,43 g/dl) y traumatológicas (2,85 g/dl), y que los perros sanos (2,85 g/dl).

El porcentaje de las globulinas α_1 y α_2 es menor en los perros con EMC (3,87% y 8,52%, respectivamente) que en los perros sanos (4,58% y 12,61%, respectivamente). El porcentaje de las α_2 -globulinas es también inferior en los perros con patologías traumatológicas (9,26%) que en los sanos.

En cuanto a las β -globulinas, éstas son inferiores tanto en valor relativo como absoluto en los perros sanos (21,90% y 1,33 g/dl, respectivamente) que en los perros con EMC (25,83% y 1,84 g/dl, respectivamente), con patologías mucocutáneas (26,60% y 1,76 g/dl) y con patologías oncológicas (27,38% y 1,78 g/dl, respectivamente).

Los valores relativos y absolutos de las γ -globulinas son superiores en los perros con EMC (22,009% y 1,75 g/dl, respectivamente) que en los perros con patologías mucocutáneas (10,37% y 0,70g g/dl), oncológicas (10,31% y 0,67 g/dl) y traumatológicas (7,96% y 0,49 g/dl) y que en los perros sanos (7,32% y 0,47 g/dl, respectivamente).

Se han encontrado también diferencias estadísticamente significativas en el valor del cociente albúmina/globulinas en función de la patología del perro estudiado, siendo este cociente inferior en los perros con EMC (0,7), en comparación con este valor en los perros con patologías mucocutáneas (0,94), digestivas (1,07), traumatológicas (1,10) y en los perros sanos (1,16). Asimismo, es superior este cociente en los perros sanos que en los perros con patologías oncológicas (0,91) y mucocutáneas.

Tabla 52: Comparación de los valores porcentuales de las subpoblaciones linfocitarias y del cociente CD4/CD8 entre las poblaciones de perros con patologías digestivas, patologías mucocutáneas, patologías oncológicas, patologías traumatológicas, EMC y perros sanos.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
% de linfocitos T (CD3+)	Digestiva	67,300	10,96	2,514	62,017	72,583	44,45	85,76	0,022
	Mucocutánea	68,719	10,52	2,551	63,31	74,128	51,79	85,7	
	Oncológica	71,966	10,005	1,89	68,086	75,846	33,59	86,73	
	Traumática	68,913	9,994	2,424	63,774	74,052	46,75	84,25	
	Ehrlichiosis	72,218	9,049	1,575	69,009	75,427	56,79	91,32	
	Sano	65,698	5,884	0,897	63,887	67,509	55,59	80,13	
% de linfocitos Th (CD3+ CD4+)	Digestiva	36,631	10,323	2,363	31,655	41,606	11,7	54,5	0,019
	Mucocutánea	35,444	8,153	1,977	31,252	39,636	20,6	51,9	
	Oncológica	34,4	7,682	1,451	31,421	37,378	13,2	47,6	
	Traumática	40,437	9,908	2,403	35,343	45,532	26,2	57,2	
	Ehrlichiosis	32,915	9,441	1,596	29,671	36,158	12,2	48,6	
	Sano	37,916	4,825	0,719	36,466	39,367	29,2	47	
% de linfocitos Tc (CD3+ CD8+)	Digestiva	20,655	7,306	1,676	17,134	24,177	9,38	39,71	0,003
	Mucocutánea	21,86	9,194	2,23	17,132	26,587	10	47,76	
	Oncológica	23,587	9,851	1,895	19,689	27,484	10,77	56,27	
	Traumática	16,281	4,112	0,997	14,166	18,395	9,56	23,78	
	Ehrlichiosis	27,988	17,286	2,922	22,05	33,926	4,64	83,43	
	Sano	19,754	7,109	1,059	17,618	21,89	7,35	35,3	
% de linfocitos B (CD21+)	Digestiva	15,438	8,229	1,887	11,472	19,405	4,23	36,05	0,126
	Mucocutánea	17,276	11,158	2,706	11,539	23,013	1,82	37,11	
	Oncológica	13,292	11,52	2,177	8,825	17,759	2,47	62,87	
	Ehrlichiosis	14,058	7,852	1,327	11,361	16,756	1,16	35,08	
	Traumática	14,385	6,347	1,539	11,121	17,648	2,52	29,84	
	Sano	18,41	6,958	1,037	16,32	20,501	4,93	31,73	
% de linfocitos CMHII+	Digestiva	85,25	12,261	3,065	78,716	91,783	54,46	96,02	0,065
	Mucocutánea	87,503	6,046	1,466	84,394	90,612	74,02	96,2	
	Oncológica	87,764	9,768	1,846	83,976	91,552	60,82	98,18	
	Traumática	88,536	7,493	1,817	84,683	92,389	74,6	97,39	
	Ehrlichiosis	91,906	5,197	0,891	90,092	93,719	77,15	98,85	
	Sano	89,016	5,202	0,775	87,453	90,579	78,7	97,2	

% de linfocitos CD3-CD21-	Digestiva	20,848	10,656	2,444	15,712	25,984	8,91	48,1	0,090
	Mucocutánea	17,34	9,028	2,189	12,697	21,982	6,79	39,27	
	Oncológica	15,203	7,58	1,432	12,263	18,142	5,5	33,42	
	Traumática	27,493	40,914	10,228	5,691	49,295	0,55	177,49	
	Ehrlichiosis	14,907	14,634	2,509	9,8	20,013	1,71	70,87	
	Sano	15,154	4,887	0,728	13,685	16,622	6,85	27,54	
Cociente CD4/CD8	Digestiva	1,979	0,823	0,188	1,583	2,376	0,41	3,3	0,110
	Mucocutánea	1,814	0,642	0,155	1,484	2,145	0,85	2,82	
	Oncológica	1,704	0,768	0,147	1,4	2,009	0,39	3,54	
	Traumática	2,681	1,223	0,296	2,052	3,31	1,66	5,98	
	Ehrlichiosis	1,827	1,776	0,3	1,217	2,438	0,14	10,46	
	Sano	2,092	0,962	0,143	1,803	2,381	0,77	4,1	

Como ha podido observarse en la tabla 52, se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ($p=0,022$) en el valor porcentual de linfocitos T CD3+ entre las diferentes poblaciones estudiadas. En concreto, el test de Bonferroni ha mostrado que dicha diferencia se encuentra entre la población de perros con EMC (que poseen de media 72,21% linfocitos T CD3+) y los perros sanos (65,59%). Además, en nuestra población de perros estudiada, se ha observado que los perros con ehrlichiosis muestran el menor porcentaje de linfocitos Th CD3+CD4+ (32,91%) y el mayor porcentaje de linfocitos Tc CD3+CD8+ (27,98%) de todos los grupos estudiados.

Tabla 53: Valores absolutos de las diferentes subpoblaciones estudiadas por citometría de flujo entre las diferentes poblaciones de perros incluidas en este trabajo.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
Linfocitos T (CD3+)/μl	Digestiva	1359,95	822,22	199,42	937,21	1782,70	526,11	3342,01	0,000
	Mucocutánea	1860,60	586,32	142,20	1559,14	2162,06	713,14	3002,07	
	Oncológica	1262,28	585,99	110,74	1035,06	1489,51	71,86	2907,72	
	Traumática	1314,06	584,44	141,75	1013,58	1614,56	260,33	2524,08	
	Ehrlichiosis	2139,39	1379,88	240,21	1650,10	2628,67	289,39	6856,73	
	Sano	1869,25	547,67	81,64	1704,71	2033,79	933,62	3083,38	

Linfocitos Th (CD3+ CD4+)/μl	Digestiva	771,96	599,65	145,44	463,66	1080,27	188,47	2358,84	0,007
	Mucocutánea	970,32	342,04	82,96	794,46	1146,18	282,97	1493,67	
	Oncológica	594,07	304,80	57,60	475,88	712,26	36,83	1162,25	
	Traumática	775,82	383,78	93,08	578,50	973,14	159,07	1584,70	
	Ehrlichiosis	1006,82	919,79	155,47	690,87	1322,78	132,26	5668,62	
	Sano	1080,14	400,13	58,36	962,67	1197,63	290,13	1986,81	
Linfocitos Tc (CD3+ CD8+)/μl	Digestiva	387,08	174,32	42,28	297,45	476,70	126,07	739,80	0,000
	Mucocutánea	578,60	227,18	55,10	461,80	695,41	137,70	1057,36	
	Oncológica	408,70	255,45	49,16	307,64	509,75	12,60	1277,15	
	Traumática	309,20	151,37	36,71	231,37	387,02	73,48	643,04	
	Ehrlichiosis	1117,54	1450,16	245,12	619,40	1615,70	50,00	6264,09	
	Sano	506,20	171,44	26,14	453,44	558,96	189,84	844,61	
Linfocitos B (CD21+)/μl	Digestiva	394,93	465,87	112,99	155,40	634,46	55,81	1674,63	0,003
	Mucocutánea	494,01	404,58	98,12	285,99	702,03	40,40	1339,12	
	Oncológica	244,56	243,23	45,97	150,24	338,88	3,61	1065,01	
	Traumática	290,33	164,13	39,81	205,94	374,72	7,78	587,50	
	Ehrlichiosis	355,42	239,29	40,45	273,22	437,62	26,00	1206,50	
	Sano	527,57	318,71	47,51	431,82	623,32	39,04	1198,29	
Linfocitos CMHII+/μl	Digestiva	1490,32	964,57	257,79	933,40	2047,25	487,81	3931,79	0,000
	Mucocutánea	2411,18	812,17	196,98	1993,60	2828,76	1019,25	4134,28	
	Oncológica	1555,82	739,93	139,83	1268,90	1842,73	68,09	3997,09	
	Traumática	1713,25	741,98	179,96	1331,75	2094,74	294,32	3022,01	
	Ehrlichiosis	2971,20	2537,88	435,24	2085,69	3856,71	370,32	14353,30	
	Sano	2538,80	977,53	144,13	2248,51	2829,09	849,69	4642,27	
Linfocitos CD3- CD21-/μl	Digestiva	406,24	309,65	75,10	247,03	565,45	90,89	1177,20	0,819
	Mucocutánea	435,54	175,62	42,59	345,25	525,84	168,50	869,40	
	Oncológica	471,56	1175,11	222,07	15,90	927,22	31,06	6405,36	
	Traumática	296,17	187,80	46,95	196,10	396,24	12,60	671,76	
	Ehrlichiosis	309,76	197,24	33,83	240,94	378,58	1,15	868,94	
	Sano	417,55	167,21	24,93	367,32	467,79	128,23	896,70	

En este trabajo se ha observado que los perros con EMC presentan un mayor número de linfocitos T CD3+/ μ l en sangre periférica (2139,39/ μ l) que los perros con patologías digestivas (1359,95/ μ l), oncológicas (1262,28/ μ l) y traumatológicas (1314,06/ μ l). Asimismo, los perros sanos presentan un mayor número de estos linfocitos T CD3+ (1869,25/ μ l) que los perros con patologías oncológicas.

Por otra parte, los perros con patologías oncológicas presentan un menor número de linfocitos Th CD3+CD4+ (594,06/ μ l) y de linfocitos B CD21+ (244,56/ μ l) que los perros sanos de este trabajo (1080,14 linfocitos Th/ μ l y 527,57/ μ l linfocitos B/ μ l).

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el número de linfocitos Tc CD3+CD8+/ μ l de sangre periférica entre las diferentes poblaciones estudiadas, mostrando los perros con EMC un mayor número de estos linfocitos (1117,54/ μ l).

Asimismo, los perros con EMC del estudio han mostrado un mayor número de linfocitos sanguíneos que expresan CMH de clase II en su superficie (2971,204/ μ l) que los perros con patologías digestivas (1490,32/ μ l), oncológicas (1555,82/ μ l) y traumatológicas (1713,25/ μ l).

Tabla 54: Comparación de los valores de concentración de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α en sangre periférica en las poblaciones caninas sana y con EMC de este estudio.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Valor de p
					Límite inferior	Límite superior			
Concentración IFN- γ (pg/ml)	Ehrlichiosis	95,51	223,907	38,399	17,385	173,635	0,000	1119,180	0,362
	Sano	47,85	26,552	6,091	35,053	60,649	9,060	103,240	
Concentración IL-6 (pg/ml)	Ehrlichiosis	36,01	41,344	7,425	20,854	51,184	0,000	191,920	0,367
	Sano	47,08	35,338	8,834	28,258	65,919	0,000	117,500	
Concentración IL-10 (pg/ml)	Ehrlichiosis	19,96	68,868	12,174	0,000	44,790	0,000	370,000	0,135
	Sano	0,55	1,713	0,318	0,000	1,200	0,000	8,000	
Concentración TNF- α (pg/ml)	Ehrlichiosis	24,27	51,935	8,906	6,154	42,397	0,000	215,370	0,355
	Sano	13,20	13,291	2,972	6,981	19,422	0,000	48,560	

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre la población de perros sanos y la población de perros con EMC para los valores de concentración en sangre periférica de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α .

5.6. ENSAYO CLÍNICO: EVOLUCIÓN DE LAS VARIABLES ANALIZADAS A LO LARGO DEL TIEMPO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE DOXICICLINA EN PERROS SANOS Y EN PERROS CON EMC

Con la finalidad de evaluar el efecto a lo largo del tiempo de la doxiciclina sobre las diferentes variables analizadas en este trabajo, se llevaron a cabo una serie de controles programados tras el inicio de la administración del fármaco en un número de perros sanos y en los perros diagnosticados de EMC incluidos en este estudio. Para ello, se administró el fármaco a un total de 12 animales sanos pertenecientes al Grupo 1 y se llevaron a cabo los controles establecidos y descritos en el apartado de Materiales y Métodos. En el caso de los perros con EMC, a pesar de que se programaron los mismos controles para todos los animales, al final del estudio se disponía de datos de los 4 controles clínicos y laboratoriales establecidos de un total de 20 perros, siendo excluidos del ensayo clínico aquellos perros con EMC del Grupo 2 de los que se carecía de datos de seguimiento de alguno de los citados controles.

Para evaluar el efecto del fármaco a lo largo del tiempo se han comparado los valores obtenidos para cada variable antes del tratamiento con doxiciclina (día 0) y en los diferentes controles post-tratamiento (días 30, 90 y 180), tanto en los perros sanos como en los perros con EMC. Además, se ha evaluado si el comportamiento de estas variables a lo largo del tiempo ha sido similar para los dos grupos o si, por el contrario, han seguido evoluciones diferentes.

A continuación se describirá para cada variable, en primer lugar, si su comportamiento en el tiempo es similar en los dos grupos de perros o si difieren en la evolución que se produce, para pasar a describir, a continuación, si la variable sufre modificaciones estadísticamente significativas a lo largo del tiempo del estudio o si, por el contrario, permanece constante.

5.6.1. EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL ERITROGRAMA E ÍNDICES ERITROCITARIOS

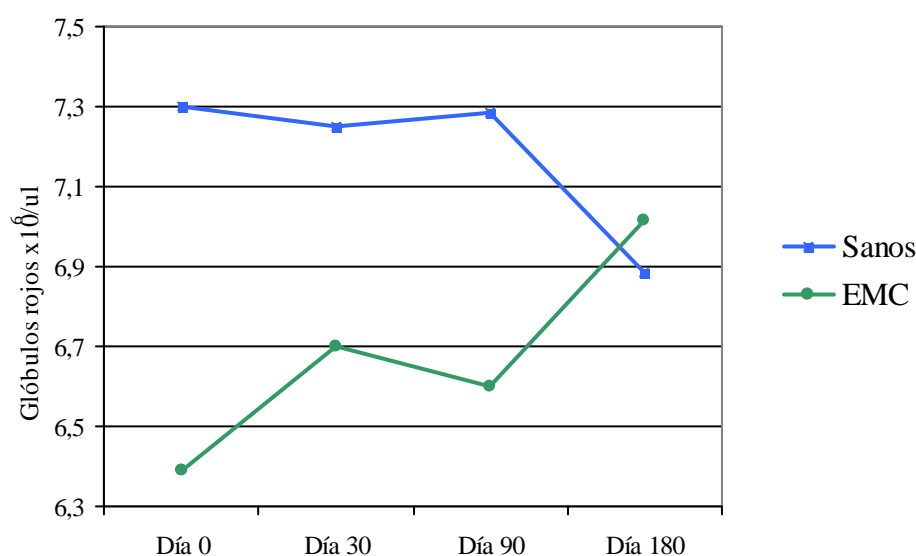
➤ Glóbulos rojos

En la tabla 55 y en el gráfico 9 se ha reflejado la evolución del número de glóbulos rojos a lo largo de los 6 meses durante los que se ha hecho el seguimiento de los perros sanos y de los perros con EMC a los que se les administró doxiciclina.

Tabla 55: Recuento de glóbulos rojos en los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) en los días 0, 30, 90 y 180 del estudio

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (x10 ⁶ /μl)	Desviación típica	Media (x10 ⁶ /μl)	Desviación típica	Media (x10 ⁶ /μl)	Desviación típica
Día 0	7,302	0,792	6,392	1,101	6,733	1,026
Día 30	7,248	0,748	6,698	0,881	6,904	0,864
Día 90	7,286	0,790	6,602	0,889	6,858	0,905
Día 180	6,887	0,445	7,014	0,918	6,966	0,769

Gráfico 9: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del número de glóbulos rojos/μl en los perros sanos (Grupo 1) y perros con EMC (Grupo 2) antes (día 0) y tras (días 30, 90 y 180) el tratamiento con doxiciclina.



El estudio estadístico de estos datos mediante un análisis de medidas repetidas nos muestra la existencia de un comportamiento diferente a lo largo del tiempo del recuento de glóbulos rojos entre los perros sanos a los que se les administró doxiciclina y los perros con EMC ($p=0,004$), concretamente entre los días 90 y 180 del estudio.

En el caso del Grupo 1 (perros sanos), no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medias del recuento de glóbulos rojos en los diferentes controles realizados ($p=0,190$). En cambio, en el Grupo 2 (perros con EMC), se observa la existencia de un cambio estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 95% para el recuento eritrocitario desde el momento inicial al momento final del estudio ($p=0,013$), aumentando este valor entre los días 90 y 180.

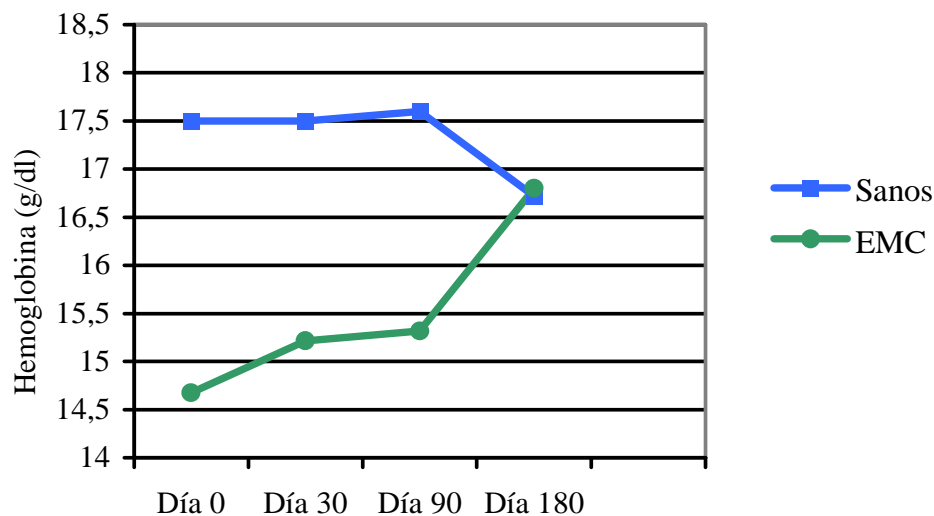
➤ Hemoglobina

En la tabla 56 y en la gráfica 10 se muestran los valores de la concentración de hemoglobina en los controles realizados antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2.

Tabla 56: Concentración de hemoglobina en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	17,500	1,467	14,675	2,397	15,677	2,499
Día 30	17,500	1,263	15,215	1,842	16,026	1,979
Día 90	17,600	1,654	15,315	2,079	16,126	2,210
Día 180	16,718	0,955	16,800	2,339	16,771	1,942

Gráfico 10: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de la concentración de hemoglobina en los perros del Grupo 1 y en los perros del Grupo 2



Al igual que en el caso del recuento eritrocitario, y como puede observarse en el gráfico 10 la concentración de hemoglobina muestra una evolución en el tiempo estadísticamente diferente entre los perros sanos a los que se les administró doxiciclina (Grupo 1) y los perros con EMC (Grupo 2) ($p=0,000$), concretamente entre los días 90 y 180.

La concentración de hemoglobina en los perros sanos no muestra variaciones a lo largo del tiempo tras la administración del fármaco ($p=0,276$). En cambio, en los perros con EMC del Grupo 2 de este estudio se observa la existencia de cambios estadísticamente significativos en la concentración de hemoglobina a lo largo de los controles realizados ($p=0,000$) y estos cambios se reflejan en un aumento gradual de esta variable, como puede observarse en el gráfico 10.

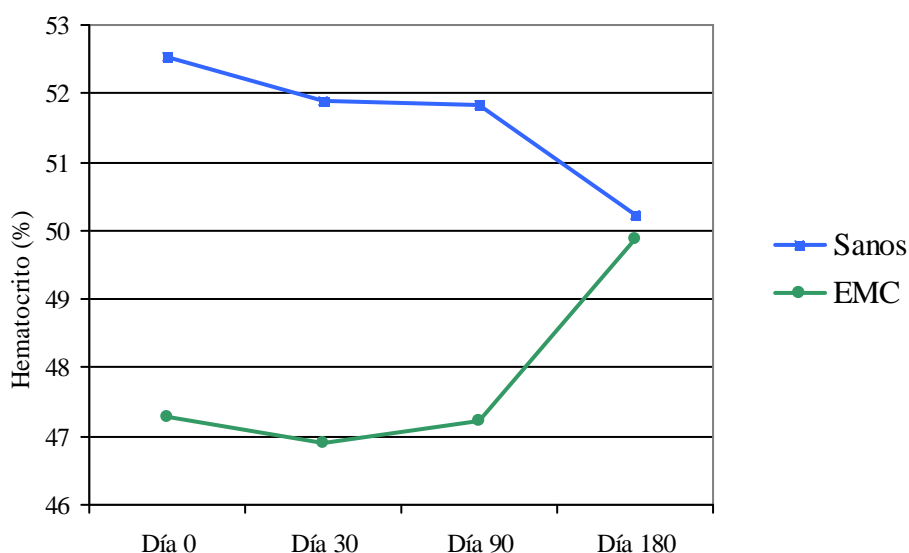
➤ Hematocrito

A continuación puede observarse en la tabla 57 y gráfico 11 la evolución a lo largo del tiempo del valor del hematocrito en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2.

Tabla 57: Valores del hematocrito en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) desde el día 0 hasta el día 180 del estudio

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	52,54	5,83	47,27	7,53	49,25	7,32
Día 30	51,88	5,81	46,90	5,56	48,77	6,08
Día 90	51,83	5,20	47,22	5,79	48,95	5,94
Día 180	50,22	3,70	49,87	6,45	50,00	5,51

Gráfico 11: Evolución del hematocrito en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) desde el día 0 hasta el día 180 del estudio



En los resultados del hematocrito de los perros de los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) obtenidos en los controles realizados antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina, se observa un comportamiento similar en la evolución de esta variable a lo largo del tiempo para ambos grupos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ($p=0,072$).

Además, no se ha encontrado la existencia de cambios estadísticamente significativos para esta variable a lo largo del tiempo ($p=0,877$).

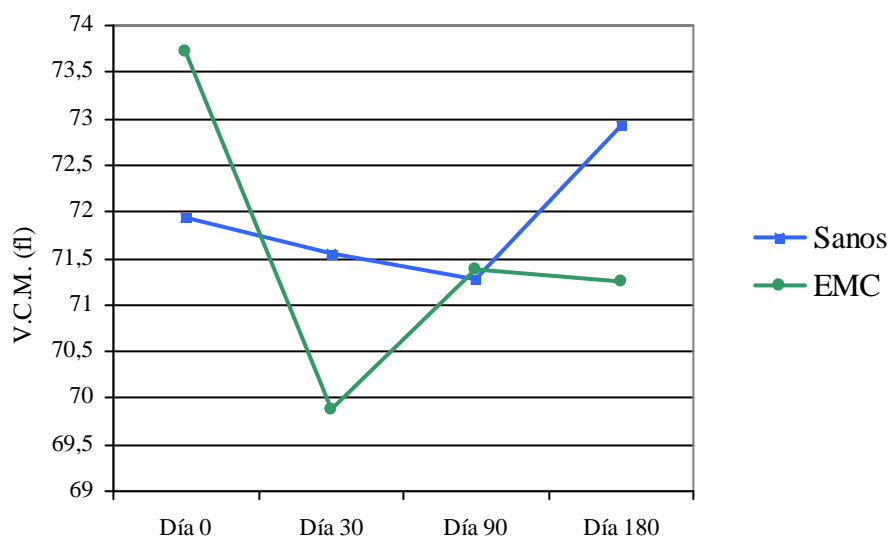
➤ **V.C.M.**

En la tabla 58 y en el gráfico 12 se puede observar la evolución que ha seguido a lo largo del tiempo del estudio el valor del V.C.M. de los perros tratados con doxiciclina (grupos 1 y 2).

Tabla 58: V.C.M. de los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) desde el día 0 hasta el día 180 del estudio

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (fl)	Desviación típica	Media (fl)	Desviación típica	Media (fl)	Desviación típica
Día 0	71,93	2,25	73,73	5,49	73,03	4,55
Día 30	71,55	3,53	69,89	3,91	70,54	3,79
Día 90	71,27	2,85	71,39	2,70	71,34	2,71
Día 180	72,93	3,26	71,26	3,66	71,91	3,55

Gráfico 12: Evolución del V.C.M. en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) desde el día 0 hasta el día 180 del estudio



La evolución del valor del V.C.M. desde el día 0 hasta el día 180 del estudio es estadísticamente diferente en los perros sanos a los que se les administró doxiciclina y en los perros con EMC tras el tratamiento con el fármaco ($p=0,013$), encontrándose este comportamiento diferente en la evolución desde el día 0 al día 30.

En el Grupo 1 (perros sanos), no existen cambios estadísticamente significativos a lo largo del tiempo en el valor del V.C.M. ($p=0,102$), mientras que en el Grupo 2 (perros

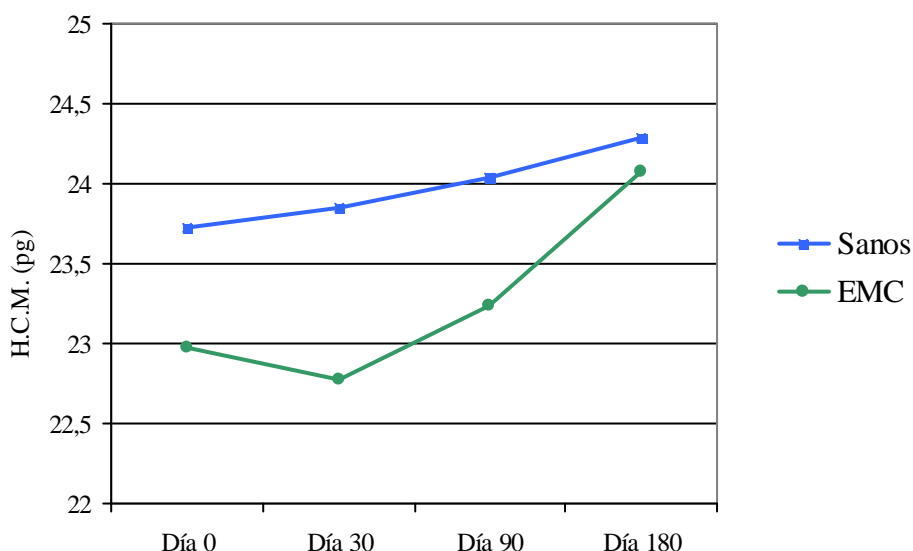
con EMC) sí se producen ($p=0,001$). En concreto, en los perros con EMC se observa un descenso inicial del V.C.M. entre el día 0 y el día 30 seguido de un incremento de esta variable entre el día 30 y el día 90.

➤ H.C.M.

Tabla 59: H.C.M. en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (pg)	Desviación típica	Media (pg)	Desviación típica	Media (pg)	Desviación típica
Día 0	23,727	1,324	22,975	1,257	23,242	1,311
Día 30	23,845	0,833	22,775	1,405	23,155	1,324
Día 90	24,036	0,877	23,235	1,156	23,519	1,120
Día 180	24,282	0,872	24,075	2,769	24,148	2,263

Gráfico 13: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de la H.C.M. en los perros del Grupo 1 (sanos) y en los perros del Grupo 2 (con EMC)



En este caso, no se observan diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el comportamiento de la H.C.M. a lo largo del tiempo entre ambos grupos ($p=0,446$), es decir, el valor de esta variable sigue una evolución similar en las dos poblaciones.

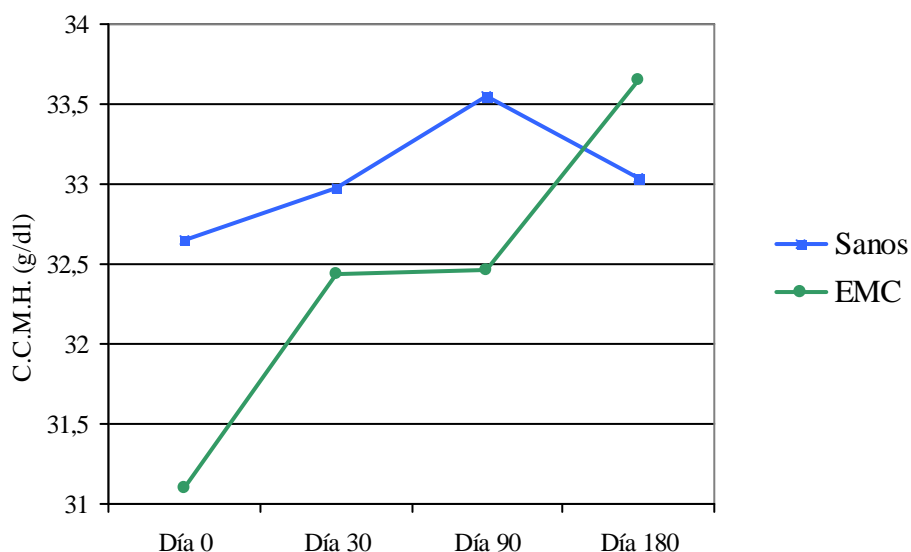
Esta variable sufre cambios estadísticamente significativos a lo largo del tiempo del estudio ($p=0,046$), observándose una tendencia general al alza desde el inicio del estudio hasta el final.

➤ **C.H.C.M.**

Tabla 60: C.H.C.M. en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	32,655	1,112	31,100	1,870	31,652	1,788
Día 30	32,973	0,649	32,435	1,146	32,626	1,020
Día 90	33,545	0,623	32,466	2,002	32,849	1,715
Día 180	33,036	1,169	33,655	3,135	33,435	2,602

Gráfico 14: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de la C.H.C.M. en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



La evolución de la C.H.C.M. a lo largo del tiempo ha mostrado ser similar en los dos grupos estudiados ($p=0,115$), no observándose diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el comportamiento de esta variable en el tiempo entre los grupos.

En ambos grupos el valor de esta variable tiende a aumentar desde el día 0, siendo los cambios observados significativos para un nivel de confianza del 95% ($p=0,029$).

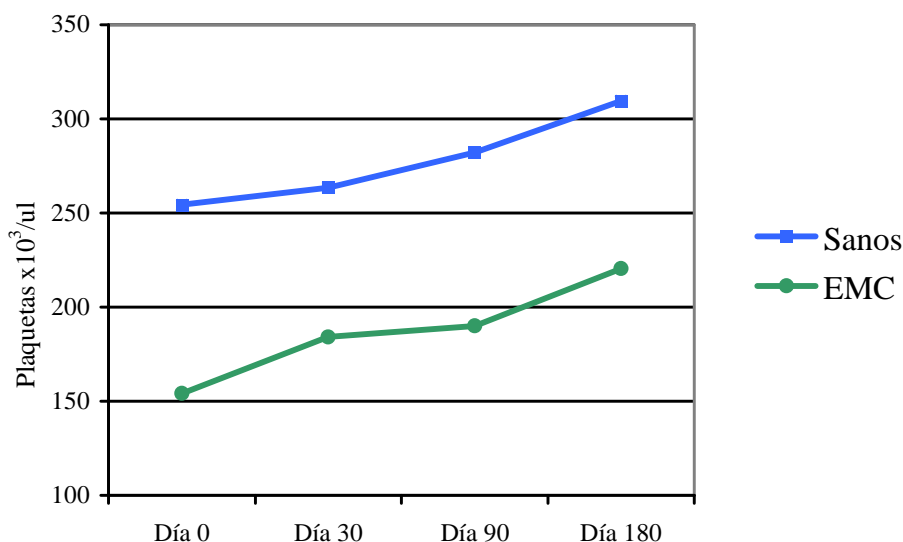
5.6.2. EVOLUCIÓN DEL RECuento PLAQUETARIO A LO LARGO DEL TIEMPO

Los resultados del recuento de plaquetas a partir de las muestras sanguíneas de los perros sanos del Grupo 1 y de los perros con EMC del Grupo 2 a lo largo de los controles de los días 0, 30, 90 y 180 del estudio se han reflejado en la tabla 61 y en el gráfico 15.

Tabla 61: Número de plaquetas/ μl en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Desviación típica	Media ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Desviación típica	Media ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Desviación típica
Día 0	254,33	63,922	154,15	79,389	191,72	87,983
Día 30	263,42	65,301	184,25	64,129	213,94	74,498
Día 90	282,17	59,579	190,10	80,769	224,63	85,491
Día 180	309,50	61,861	220,40	105,133	253,81	100,265

Gráfico 15: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del número de plaquetas en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



Como se observa en el gráfico 15, la evolución a lo largo del tiempo del número de plaquetas de los perros ha sido similar en ambos grupos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el comportamiento de esta variable en el tiempo entre las dos poblaciones ($p=0,843$).

Sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas entre el número de plaquetas por microlitro de sangre a lo largo del tiempo ($p=0,003$), observándose una tendencia a aumentar para esta variable desde el inicio del estudio hasta su finalización.

5.6.3. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LOS RECuentOS LEUCOCITARIOS

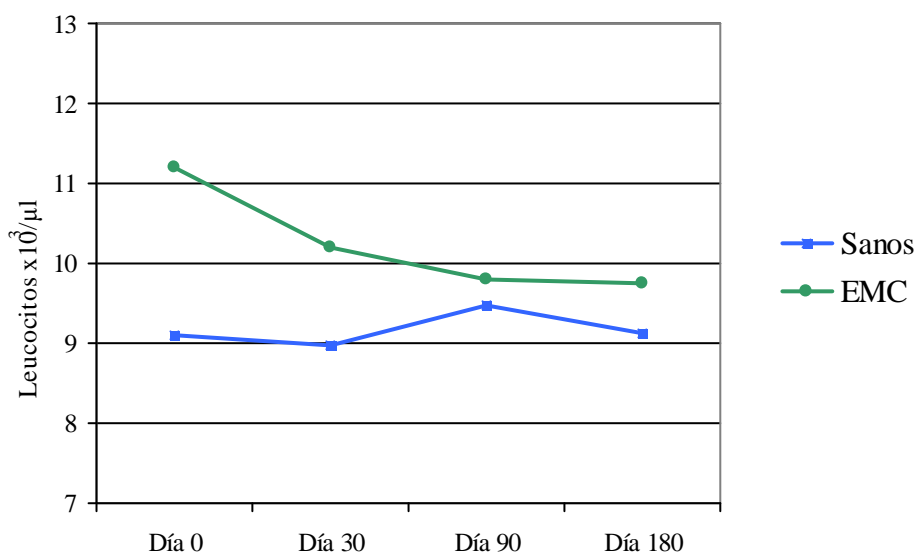
➤ Recuento leucocitario

En la tabla 62 y en el gráfico 16 se detalla el número de glóbulos blancos por microlitro de sangre en los perros sanos del grupo 1 y en los perros con EMC del grupo 2 en los 4 controles realizados en el estudio.

Tabla 62: Número de leucocitos/ μl en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Desviación típica	Media ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Desviación típica	Media ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Desviación típica
Día 0	9,103	3,550	11,202	8,229	10,415	6,859
Día 30	8,973	2,283	10,190	3,423	9,734	3,064
Día 90	9,485	3,058	9,790	3,622	9,676	3,373
Día 180	9,122	2,123	9,762	3,117	9,522	2,766

Gráfico 16: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del número de leucocitos en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo del número de leucocitos en sangre entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2 ($p=0,488$), siguiendo, por tanto, esta variable un comportamiento similar en ambas poblaciones.

Tampoco se han hallado diferencias estadísticamente significativas del número de leucocitos entre los diferentes tiempos del estudio, no mostrando este parámetro una evolución a lo largo del tiempo estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95% ($p=0,610$).

➤ Neutrófilos

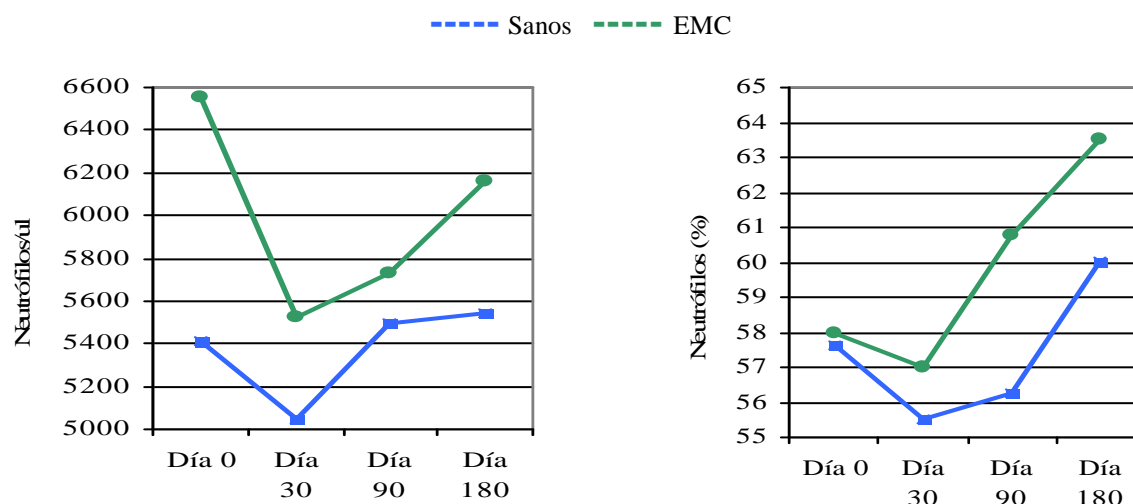
A continuación pueden observarse en las tablas 63 A y B y en el gráfico 17 los resultados del recuento relativo y absoluto de los neutrófilos en los controles de los días 0, 30, 90 y 180 de los grupos 1 y 2.

Tabla 63: Número de neutrófilos/ μl (A) y porcentaje (B) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina.

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media / μl	Desviación típica	Media / μl	Desviación típica	Media / μl	Desviación típica
Día 0	5412,800	2887,777	6555,010	7003,620	6126,680	5773,912
Día 30	5049,020	1761,892	5527,010	1780,743	5347,770	1760,776
Día 90	5495,860	2660,940	5734,300	1835,136	5644,880	2142,502
Día 180	5541,390	1669,814	6155,900	2412,834	5925,460	2156,138

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	57,630	8,955	57,960	17,870	57,840	14,973
Día 30	55,490	7,006	57,010	15,700	56,440	13,002
Día 90	56,270	8,895	60,790	12,834	59,090	11,575
Día 180	60,050	6,624	63,530	12,078	62,220	10,388

Gráfico 17: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del número de neutrófilos/ μl (izquierda) y el porcentaje de neutrófilos (derecha) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



Al igual que en el caso del recuento leucocitario, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo tanto del valor absoluto ($p=0,761$) como del valor relativo ($p=0,604$) de los neutrófilos en sangre entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2, siguiendo, por tanto, estas variables un comportamiento similar en ambas poblaciones.

Tampoco se han hallado diferencias en el número de neutrófilos entre los diferentes tiempos del estudio, no mostrando este parámetro una evolución a lo largo del tiempo estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95% ($p=0,577$). Sin embargo, el valor porcentual de estas células sí ha mostrado cambios estadísticamente significativos a lo largo del tiempo ($p=0,037$), mostrando, como puede observarse en el gráfico 17, un incremento gradual desde el día 30 hasta el día 180.

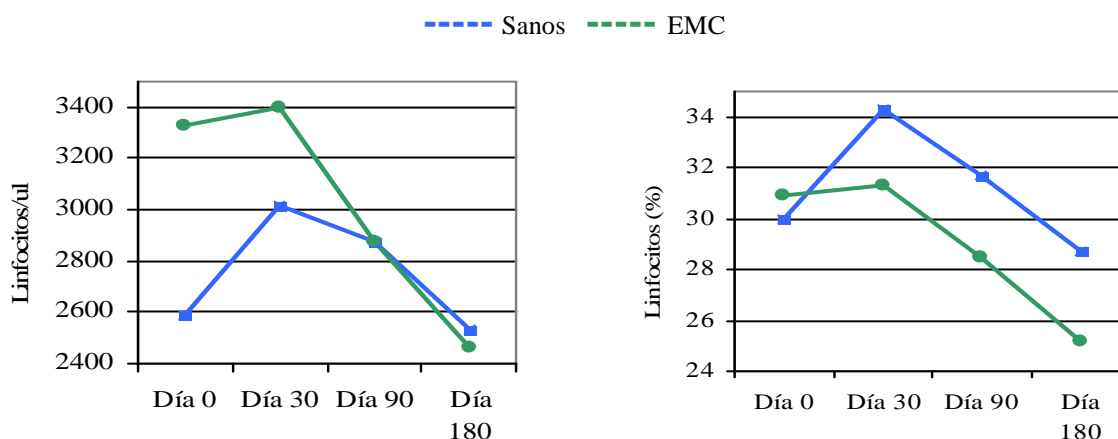
➤ Linfocitos

Tabla 64: Número de linfocitos/ μl (A) y porcentaje de linfocitos (B) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina.

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media / μl	Desviación típica	Media / μl	Desviación típica	Media / μl	Desviación típica
Día 0	2586,79	868,764	3326,25	3199,247	3048,95	2583,270
Día 30	3014,20	697,193	3396,74	2659,183	3253,29	2131,168
Día 90	2878,89	541,381	2873,21	1799,004	2875,34	1444,859
Día 180	2534,59	492,109	2459,58	1489,998	2487,71	1203,327

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	29,94	8,038	30,94	17,034	30,56	14,177
Día 30	34,32	6,238	31,28	16,697	32,42	13,672
Día 90	31,73	6,182	28,50	12,931	29,71	10,889
Día 180	28,70	6,445	25,18	11,768	26,50	10,131

Gráfico 18: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del número de linfocitos/ μ l (izquierda) y el porcentaje de linfocitos (derecha) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



La evolución en el tiempo tanto del valor absoluto ($p=0,348$) como del valor porcentual ($p=0,399$) de los linfocitos en sangre no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre los perros sanos del grupo 1 y los perros con EMC del grupo 2, siguiendo, por tanto, estas variables un comportamiento similar en ambas poblaciones.

El valor absoluto de linfocitos tampoco ha mostrado cambios estadísticamente significativos a lo largo de los diferentes tiempos del estudio ($p=0,106$), mientras que en el caso del porcentaje, se han hallado diferencias estadísticamente significativas en los diferentes controles ($p=0,012$), produciéndose una disminución del porcentaje de linfocitos entre el día 90 y el día 180.

➤ Monocitos

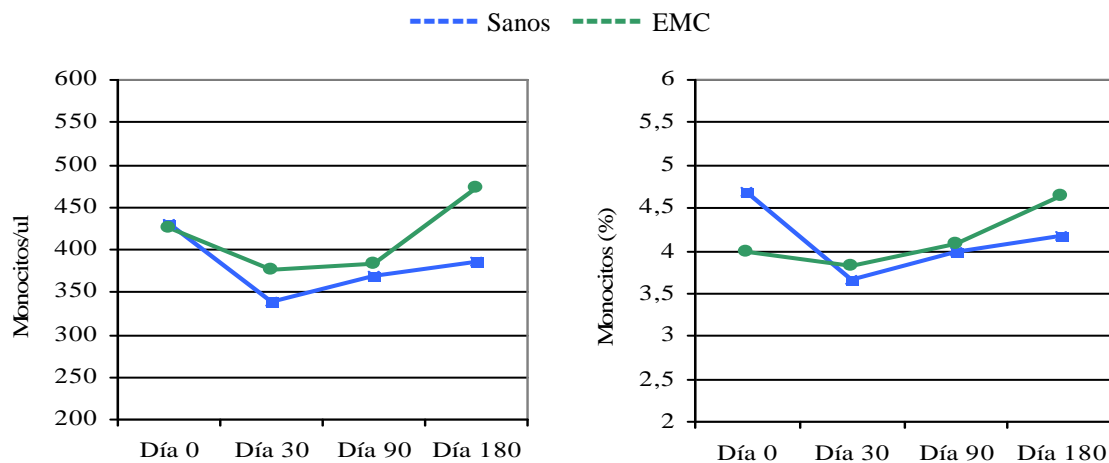
A continuación se muestran los resultados obtenidos para los valores absolutos y porcentuales de monocitos en los grupos 1 y 2 en los controles realizados a lo largo del estudio (tablas 65A y B y gráfico 19).

Tabla 65: Valor absoluto (A) y porcentual (B) de monocitos en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina.

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media / μ l	Desviación típica	Media / μ l	Desviación típica	Media / μ l	Desviación típica
Día 0	430,91	215,018	426,21	272,838	428,03	248,237
Día 30	337,89	145,902	377,22	167,642	362,00	158,262
Día 90	369,47	111,834	384,07	177,259	378,41	153,266
Día 180	386,54	149,128	471,90	362,396	438,86	297,891

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	4,68	1,074	3,98	1,301	4,25	1,247
Día 30	3,67	0,876	3,82	1,753	3,76	1,460
Día 90	3,98	0,931	4,09	2,083	4,05	1,710
Día 180	4,18	0,998	4,65	2,451	4,47	2,007

Gráfico 19: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del número de monocitos/ μ l (izquierda) y el porcentaje de monocitos (derecha) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo de los valor absoluto ($p=0,606$) y relativo ($p=0,287$) de los monocitos entre los perros sanos del grupo 1 y los perros con EMC del grupo 2, siguiendo, por tanto, estas variables un comportamiento similar en ambas poblaciones.

Asimismo, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas para estas variables entre los diferentes tiempos del estudio ($p=0,196$ en el caso del valor absoluto de monocitos/ μl y $p=0,137$ en el caso del porcentaje de estas células), no existiendo, por tanto, cambios significativos en estas variables a lo largo del tiempo.

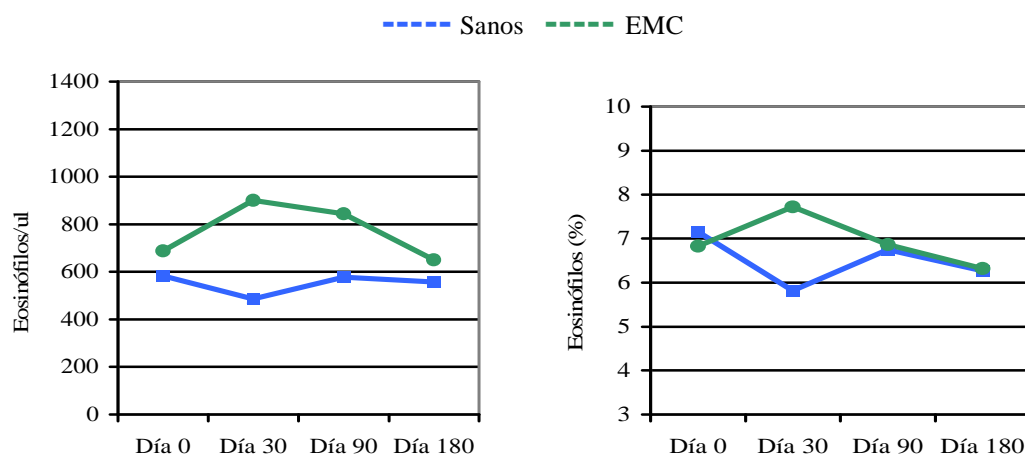
➤ Eosinófilos

Tabla 66: Valor absoluto (A) y porcentual (B) de eosinófilos en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina.

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media / μl	Desviación típica	Media / μl	Desviación típica	Media / μl	Desviación típica
Día 0	582,71	284,895	687,85	548,914	647,97	463,270
Día 30	485,71	157,175	901,07	808,323	743,52	669,022
Día 90	577,13	247,000	844,53	1085,906	743,10	869,001
Día 180	557,76	215,000	649,74	496,869	614,85	410,441

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	7,15	4,143	6,83	5,302	6,95	4,819
Día 30	5,82	2,345	7,72	5,247	7,00	4,423
Día 90	6,75	3,080	6,86	5,638	6,82	4,764
Día 180	6,27	1,706	6,32	4,041	6,30	3,309

Gráfico 20: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del número de eosinófilos/ μl (izquierda) y el porcentaje de eosinófilos (derecha) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



Tanto el valor absoluto como el valor relativo de eosinófilos siguen un comportamiento similar a lo largo del tiempo en las dos poblaciones caninas estudiadas, no habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo de estos parámetros entre los grupos 1 y 2 ($p=0,480$ para la evolución en el tiempo del valor absoluto de los eosinófilos y $p=0,588$ para la evolución en el tiempo del porcentaje de eosinófilos).

Los valores absoluto y porcentual de los eosinófilos tampoco han mostrado cambios estadísticamente significativos a lo largo de los diferentes tiempos del estudio ($p=0,709$ y $p=0,856$, respectivamente), permaneciendo, por tanto en torno a unos valores similares en todo momento.

➤ Basófilos

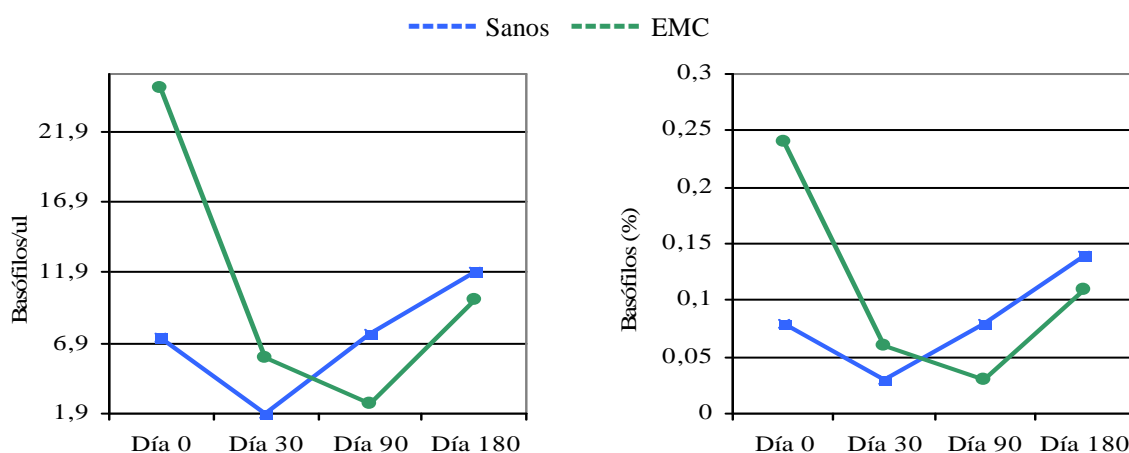
A continuación se detallan los resultados obtenidos para los valores absolutos y relativos de basófilos en los diferentes controles realizados a los perros del Grupo 1 y del Grupo 2 (tabla 67 A y B y gráfico 21).

Tabla 67: Valor absoluto (A) y porcentual (B) de basófilos en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) del tratamiento con doxiciclina.

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media / μ l	Desviación típica	Media / μ l	Desviación típica	Media / μ l	Desviación típica
Día 0	7,28	8,871	25,05	20,906	18,39	19,293
Día 30	1,96	3,575	5,88	7,599	4,41	6,607
Día 90	7,61	5,353	9,91	18,186	4,46	5,155
Día 180	11,90	10,458	2,57	4,091	10,65	15,571

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	0,08	0,087	0,24	0,228	0,18	0,203
Día 30	0,03	0,045	0,06	0,082	0,05	0,072
Día 90	0,08	0,045	0,03	0,047	0,05	0,051
Día 180	0,14	0,131	0,11	0,201	0,12	0,177

Gráfico 21: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del número de basófilos/ μ l (izquierda) y el porcentaje de basófilos (derecha) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



Tanto el valor absoluto como el valor relativo de los basófilos evolucionan en el tiempo de forma diferente entre los grupos 1 y 2, habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el comportamiento en el tiempo de estos parámetros entre las dos poblaciones caninas estudiadas ($p=0,010$)

para la evolución del número de basófilos/ μl y $p=0,029$ para la evolución del porcentaje de estas células). Las pruebas de contrastes intra-sujetos realizadas muestran que la diferencia estadística se halla en el comportamiento de los dos parámetros entre los días 0 y 30, momento en el que, aunque en ambos grupos disminuyen estas variables, el descenso es mucho más marcado para el grupo 2, y entre los días 30 y 90, momento en el que los valores absolutos y relativos de los basófilos disminuyen en el grupo 2 pero tienden a aumentar en el grupo 1.

Los valores absoluto y porcentual de los basófilos en el Grupo 1 no muestran cambios estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% a lo largo del tiempo ($p=0,08$ y $p=0,076$, respectivamente). En cambio, en el Grupo 2 (perros con EMC) sí se han hallado cambios estadísticamente significativos a lo largo del tiempo en el valor absoluto ($p=0,001$) y en el valor relativo ($p=0,003$) de los basófilos, encontrándose en concreto estas diferencias entre el día 0 y el día 30.

5.6.4. EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA BÁSICA

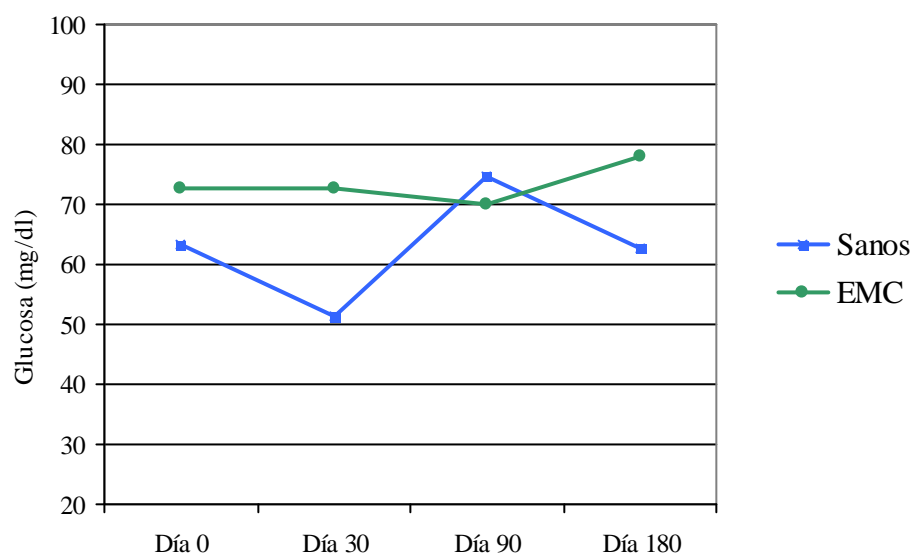
➤ Glucosa

En la tabla 68 y en el gráfico 22 se muestran los resultados de la concentración plasmática de glucosa en los perros del estudio a los que se les administró doxiciclina (grupos 1 y 2) a lo largo de los 6 meses de duración del estudio.

Tabla 68: Valores de la glucemia de los perros incluidos en el Grupo 1 (perros sanos) y en el Grupo 2 (perros con EMC) antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (mg/dl)	Desviación típica	Media (mg/dl)	Desviación típica	Media (mg/dl)	Desviación típica
Día 0	63,25	16,799	72,55	29,486	69,06	25,572
Día 30	51,50	33,760	72,75	21,997	64,78	28,465
Día 90	74,83	20,297	69,90	30,594	71,75	26,940
Día 180	62,75	26,382	77,85	26,446	72,19	27,033

Gráfico 22: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de la glucemia en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC).



No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo de la concentración plasmática de glucosa entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2 ($p=0,102$), siguiendo, por tanto, esta variable un comportamiento similar en ambas poblaciones.

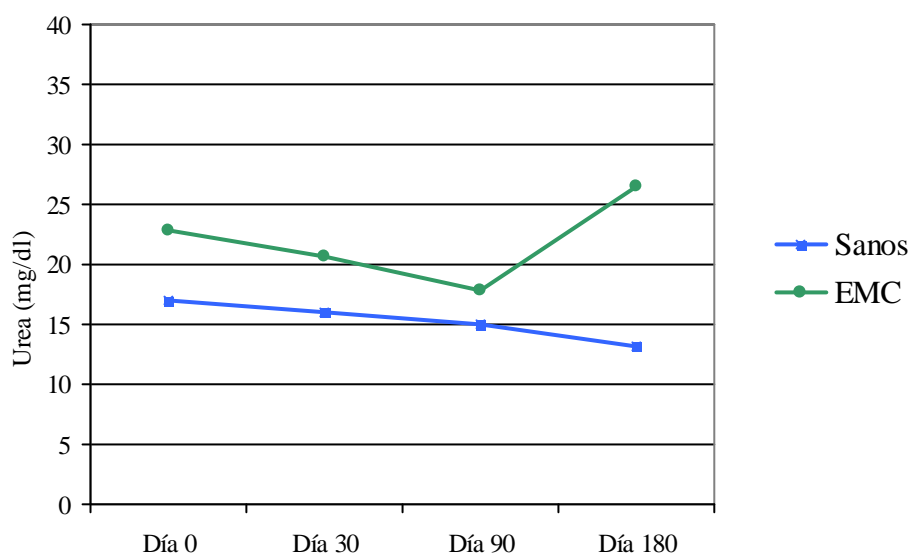
No existen diferencias estadísticamente significativas en el valor de la glucemia entre los diferentes tiempos del estudio, no observándose cambios estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% en este parámetro a lo largo del tiempo ($p=0,251$).

➤ Urea

Tabla 69: Resultados de la medición de la urea sanguínea en los perros incluidos en el Grupo 1 (perros sanos) y en el Grupo 2 (perros con EMC) de este estudio a lo largo del tiempo

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (mg/dl)	Desviación típica	Media (mg/dl)	Desviación típica	Media (mg/dl)	Desviación típica
Día 0	16,97	11,715	22,87	16,823	20,59	15,121
Día 30	15,98	6,629	20,68	14,360	18,86	12,052
Día 90	15,04	8,314	17,87	11,697	16,77	10,459
Día 180	13,14	5,204	26,53	30,997	21,35	25,107

Gráfico 23: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de la uremia en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



En este caso tampoco se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo del valor de urea en sangre entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2 ($p=0,317$), siguiendo, por tanto, esta variable un comportamiento similar en ambas poblaciones estudiadas.

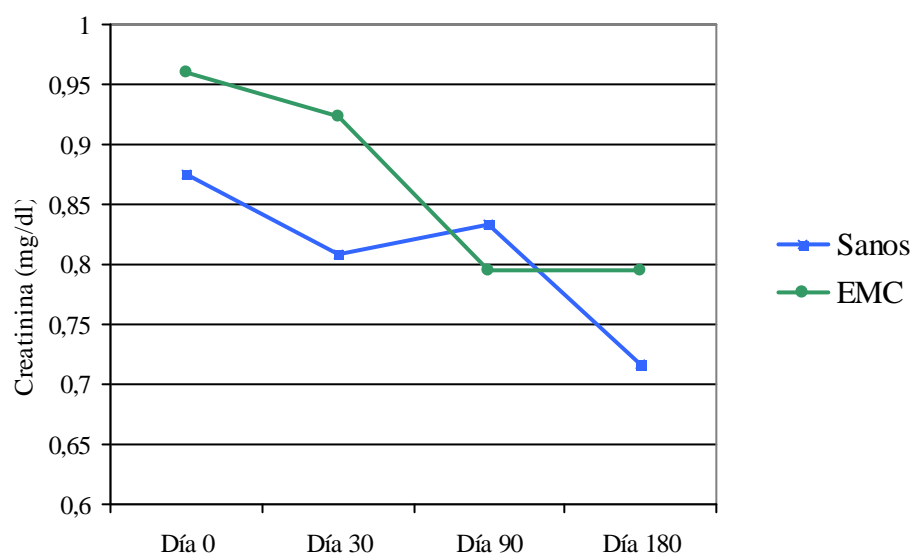
El valor de urea no sufre cambios estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% entre los diferentes momentos del estudio ($p=0,551$).

➤ Creatinina

Tabla 70: Valores de creatinina obtenidos a partir de la analítica sanguínea de los perros incluidos en los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) los días 0, 30, 90 y 180 del estudio

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (mg/dl)	Desviación típica	Media (mg/dl)	Desviación típica	Media (mg/dl)	Desviación típica
Día 0	0,875	0,128	0,960	0,321	0,928	0,266
Día 30	0,808	0,108	0,923	0,244	0,880	0,209
Día 90	0,833	0,167	0,795	0,206	0,809	0,190
Día 180	0,717	0,126	0,795	0,198	0,766	0,177

Gráfico 24: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del valor de la creatinina en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2



No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo del valor de creatinina sanguínea entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2 ($p=0,257$), siguiendo, por tanto, esta variable un comportamiento similar en ambas poblaciones.

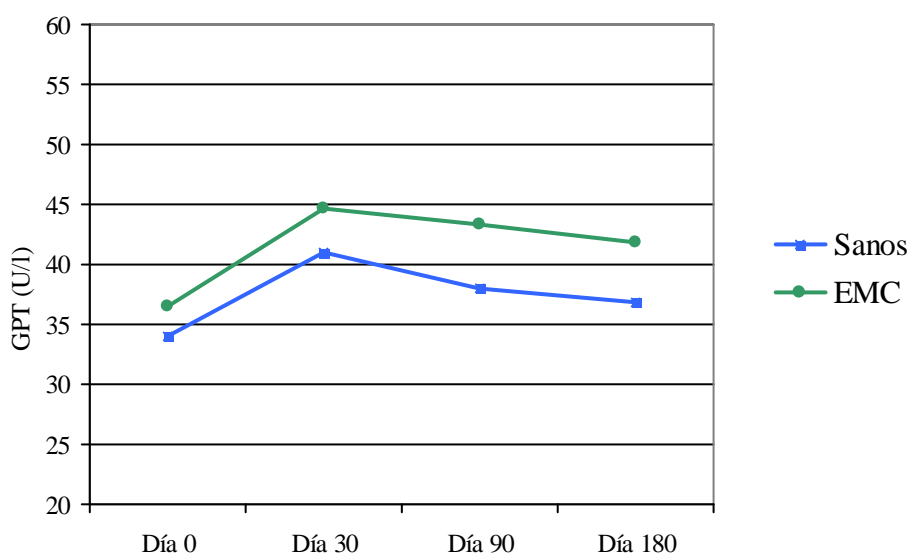
En cuanto a la evolución de esta variable a lo largo de los 6 meses del estudio, se ha observado la existencia de cambios estadísticamente significativos en su valor ($p=0,007$), destacando la disminución que se produce entre los días 90 y 180.

➤ GPT

Tabla 71: Resultados de la valoración de la GPT en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (U/l)	Desviación típica	Media (U/l)	Desviación típica	Media (U/l)	Desviación típica
Día 0	34,00	11,576	36,45	20,940	35,53	17,825
Día 30	41,08	10,326	44,70	33,106	43,34	26,697
Día 90	38,08	10,715	43,35	15,591	41,38	14,016
Día 180	36,83	12,231	41,90	15,664	40,00	14,480

Gráfico 25: Representación gráfica de la evolución a lo largo del tiempo del valor de la GPT en los perros incluidos en los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) del estudio



El comportamiento de esta variable a lo largo del tiempo no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) ($p=0,947$).

Tampoco se han hallado diferencias estadísticamente significativas para el valor de la GPT en los diferentes controles realizados ($p=0,234$), no produciéndose modificaciones de relevancia estadística en este valor a lo largo del tiempo.

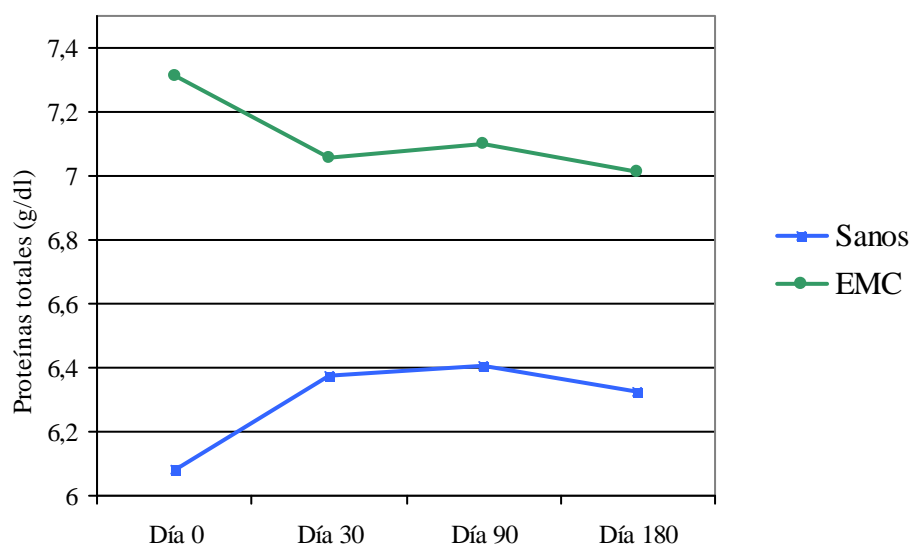
5.6.5. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LOS PARÁMETROS DEL PROTEINOGRAMA

➤ Proteínas totales

Tabla 72: Valores de las proteínas plasmáticas totales en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) en los diferentes controles realizados en el estudio

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	6,083	0,567	7,310	1,215	6,850	1,176
Día 30	6,375	0,433	7,055	1,230	6,800	1,052
Día 90	6,408	0,433	7,100	0,955	6,841	0,861
Día 180	6,325	0,400	7,010	0,775	6,753	0,734

Gráfico 26: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de la concentración plasmática de proteínas totales en los perros incluidos en los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) del estudio



A pesar de que se observa un ligero descenso de la concentración plasmática de proteínas totales entre el día 0 y el día 30 en los perros con EMC y, en cambio, un aumento de este parámetro en los perros sanos en el mismo período de tiempo (gráfico 26), su evolución no ha mostrado diferencias que sean estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) del estudio ($p=0,100$).

Tampoco se ha observado la existencia de cambios estadísticamente significativos en esta variable a lo largo del tiempo ($p=0,861$).

Sin embargo, cabe destacar que sí se ha hallado una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de proteínas totales entre ambos grupos de perros ($p=0,008$), siendo superior este valor en los perros con EMC.

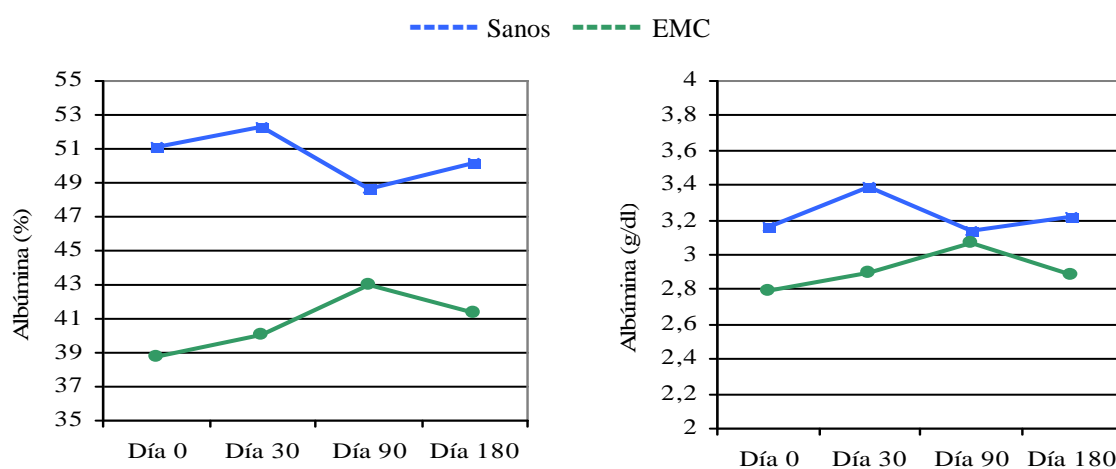
➤ Albúmina

Tabla 73: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de albúmina plasmática en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	51,141	3,505	38,791	8,669	43,571	9,327
Día 30	52,291	2,930	40,037	10,214	44,781	10,127
Día 90	48,700	3,699	43,048	7,624	45,236	6,908
Día 180	50,183	5,284	41,384	8,279	44,790	8,387

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	3,155	0,283	2,791	0,453	2,924	0,432
Día 30	3,391	0,284	2,891	0,492	3,075	0,488
Día 90	3,133	0,286	3,066	0,443	3,091	0,388
Día 180	3,221	0,264	2,889	0,521	3,011	0,468

Gráfico 27: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de albúmina plasmática en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC)



El porcentaje de albúmina plasmática ha mostrado una evolución en el tiempo estadísticamente diferente entre los grupos 1 y 2 ($p=0,032$). Más concretamente, la diferencia se encuentra en la evolución de esta variable entre el día 30 y el 90, produciéndose en el caso del Grupo 1 (perros sanos) un descenso del porcentaje de albúmina y en el Grupo 2 (perros con EMC) un incremento.

Además, en el Grupo 1 se han encontrado cambios a lo largo del tiempo en el valor porcentual de la albúmina plasmática que han resultado ser estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% ($p=0,027$), produciéndose principalmente dichas variaciones en el porcentaje de albúmina entre el día 30 y el día 90. Este porcentaje no muestra diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo en el Grupo 2 (perros con EMC).

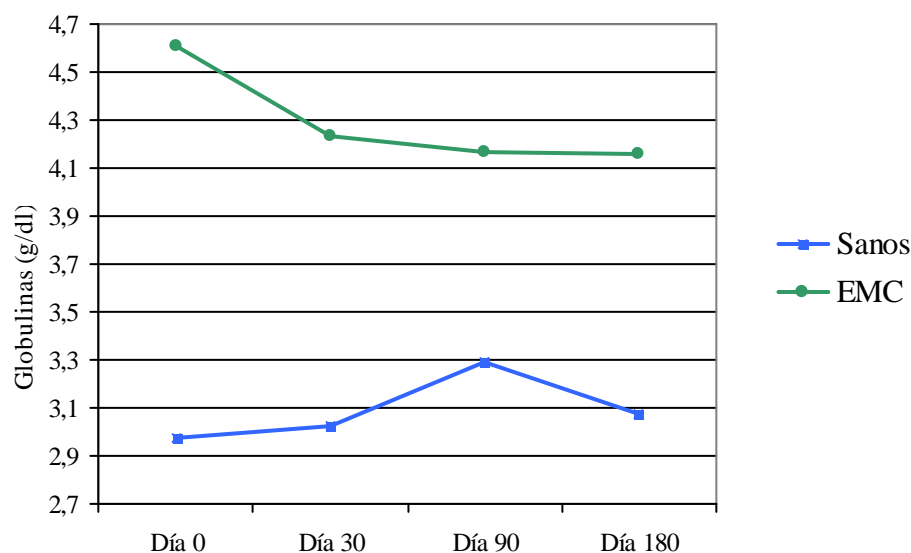
En cuanto a la evolución en el tiempo de la concentración plasmática de albúmina, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en su comportamiento entre las dos poblaciones canina estudiadas ($p=0,060$) y dicha concentración no muestra cambios estadísticamente significativos en los controles realizados a lo largo del estudio en los grupos 1 y 3 ($p=0,177$).

➤ Globulinas

Tabla 74: Concentración plasmática de globulinas en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	2,974	0,379	4,605	1,359	3,973	1,346
Día 30	3,024	0,194	4,235	1,346	3,766	1,208
Día 90	3,288	0,370	4,162	1,023	3,824	0,930
Día 180	3,071	0,518	4,162	0,901	3,740	0,936

Gráfico 28: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de la concentración plasmática de globulinas en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) del estudio



El estudio estadístico de los datos ha mostrado que no existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo de la concentración plasmática de globulinas entre los grupos 1 y 2 del trabajo ($p=0,060$).

Del mismo modo, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la concentración de globulinas en los diferentes momentos del estudio ($p=0,463$).

Sin embargo, cabe destacar que sí existen diferencias estadísticamente significativas en el valor de esta variable entre los dos grupos de perros (1 y 2) ($p=0,001$), siendo la concentración plasmática de globulinas estadísticamente superior en los perros con EMC del Grupo 2 en todos los controles realizados, como puede observarse en la tabla 74 y en el gráfico 28.

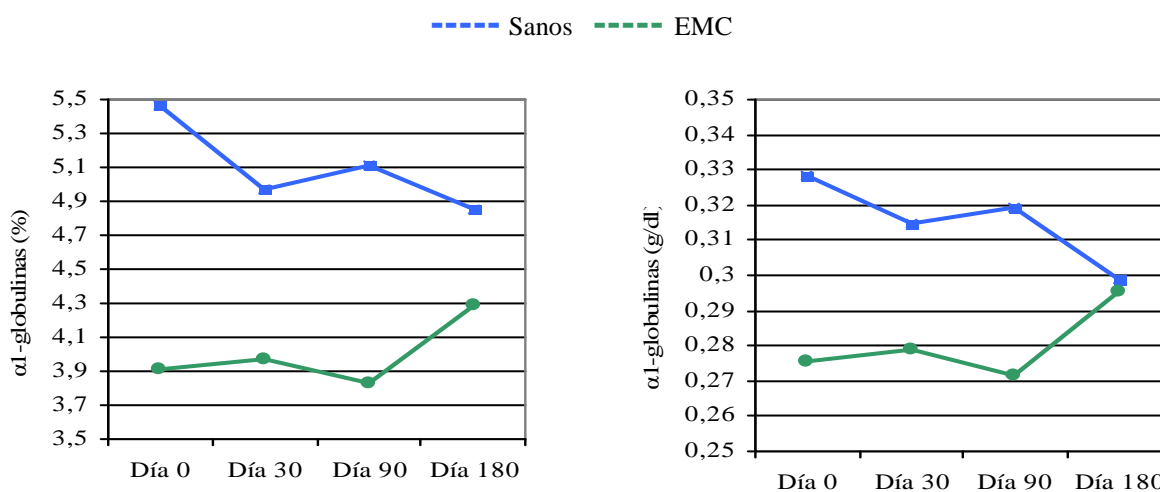
➤ $\alpha 1$ -globulinas

Tabla 75: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de $\alpha 1$ -globulinas plasmáticas en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	5,473	0,605	3,913	1,719	4,485	1,595
Día 30	4,972	0,490	3,971	1,087	4,338	1,028
Día 90	5,109	0,784	3,835	0,860	4,302	1,030
Día 180	4,854	0,653	4,295	2,430	4,500	1,972

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	0,328	0,021	0,275	0,118	0,294	0,097
Día 30	0,314	0,040	0,279	0,073	0,292	0,064
Día 90	0,319	0,042	0,271	0,055	0,289	0,055
Día 180	0,299	0,035	0,295	0,155	0,296	0,124

Gráfico 29: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de $\alpha 1$ -globulinas plasmáticas en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC)



Se ha observado que los valores porcentual y absoluto de $\alpha 1$ -globulinas en plasma de los perros sanos a los que se les administró doxiciclina (Grupo 1) y los perros con EMC que fueron tratados con este fármaco (Grupo 2) evolucionan en el tiempo de forma similar en ambas poblaciones, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento de estos parámetros entre los grupos ($p=0,206$ y $p=0,394$, respectivamente).

Tampoco existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el valor porcentual ($p=0,631$) y en el valor absoluto ($p=0,921$) de las $\alpha 1$ -globulinas entre los diferentes tiempos del estudio.

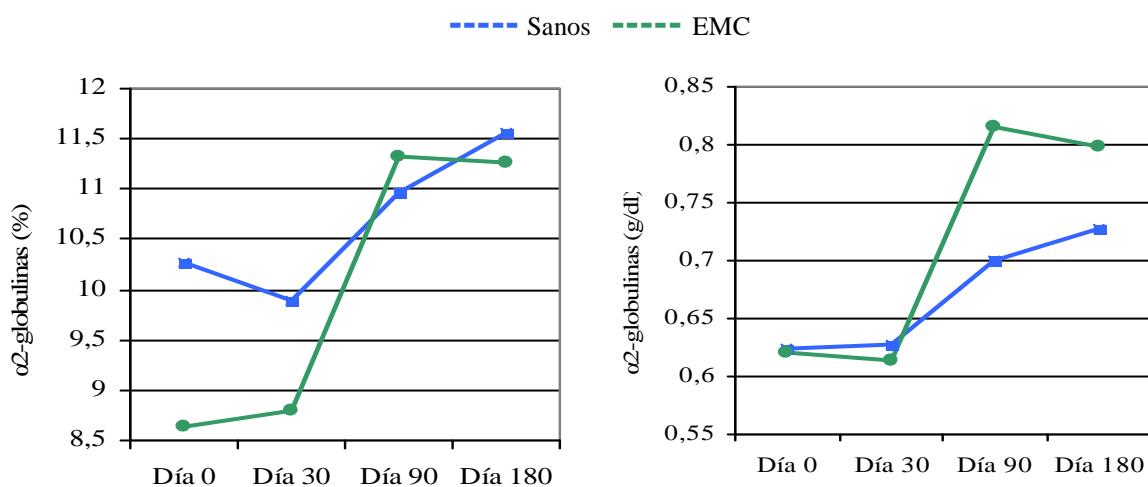
➤ $\alpha 2$ -globulinas

Tabla 76: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de $\alpha 2$ -globulinas plasmáticas en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	10,270	1,876	8,642	3,073	9,272	2,758
Día 30	9,900	1,353	8,799	3,101	9,225	2,596
Día 90	10,966	1,597	11,332	2,720	11,190	2,325
Día 180	11,566	1,796	11,272	3,177	11,386	2,695

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	0,625	0,158	0,621	0,201	0,622	0,183
Día 30	0,628	0,111	0,614	0,202	0,619	0,171
Día 90	0,700	0,132	0,815	0,205	0,771	0,187
Día 180	0,727	0,126	0,797	0,262	0,770	0,220

Gráfico 30: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de α 2-globulinas plasmáticas en los perros de los grupos 1 y 2



El comportamiento a lo largo del tiempo tanto del valor porcentual como absoluto de las α 2-globulinas es similar en los grupos 1 y 2, no habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% para la evolución de estas variables en el tiempo entre las dos poblaciones estudiadas ($p=0,152$ para el porcentaje de α 2-globulinas y $p=0,260$ para los g/dl de α 2-globulinas en plasma).

Por otra parte, estos parámetros sufren cambios estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% entre los diferentes controles realizados a lo largo del estudio ($p=0,000$ para el porcentaje de α 2-globulinas y $p=0,000$ para los g/dl de α 2-globulinas en plasma), destacando los cambios que se producen en las α 2-globulinas entre el día 30 y el día 90, donde tienden a aumentar.

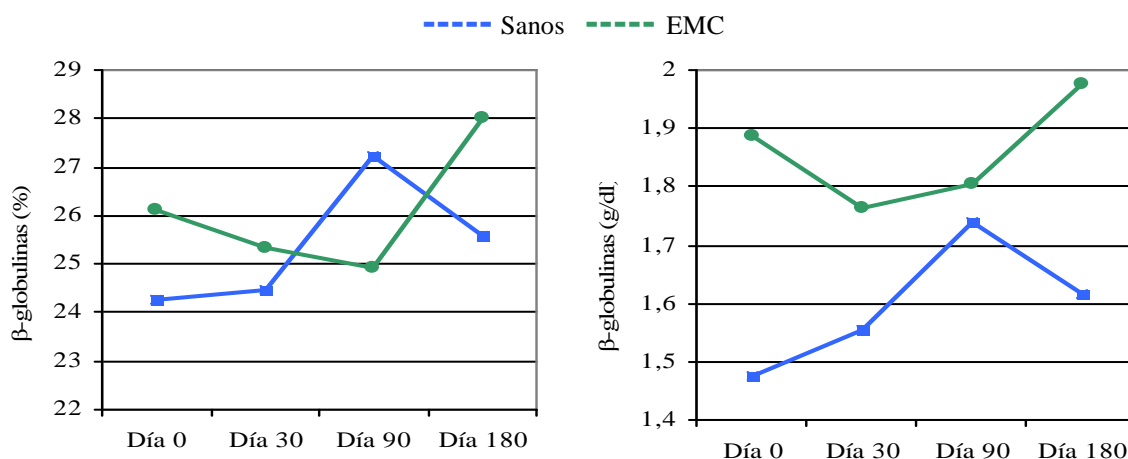
➤ **β -globulinas**

Tabla 77: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de β -globulinas plasmáticas en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	24,273	2,586	26,129	6,411	25,411	5,287
Día 30	24,466	1,491	25,340	5,780	25,001	4,588
Día 90	27,216	2,050	24,936	4,944	25,819	4,181
Día 180	25,600	2,996	28,017	5,437	27,081	4,739

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	1,477	0,232	1,887	0,434	1,728	0,417
Día 30	1,555	0,101	1,762	0,339	1,682	0,288
Día 90	1,740	0,184	1,805	0,463	1,780	0,377
Día 180	1,617	0,237	1,976	0,436	1,837	0,408

Gráfico 31: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de β -globulinas plasmáticas en los perros de los grupos 1 y 2



Tanto el valor porcentual como el valor absoluto de las β -globulinas plasmáticas evolucionan en el tiempo de forma diferente entre los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros

con EMC), habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el comportamiento en el tiempo de estos parámetros entre las dos poblaciones caninas estudiadas ($p=0,032$ para la evolución del porcentaje de β -globulinas y $p=0,032$ para la evolución de la concentración de β -globulinas en el plasma de los perros estudiados). En ambos casos, la diferencia estadística se halla en la evolución que siguen los dos parámetros entre el día 90 y el día 180, ya que mientras en los perros sanos tienden a disminuir los valores porcentual y absoluto de estas globulinas, en los perros con EMC tienden a aumentar, como puede observarse en el gráfico 31.

En el caso de los perros sanos incluidos en el Grupo 1 se ha observado que el valor porcentual y el valor absoluto de las β -globulinas cambian de forma estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95% a lo largo del tiempo ($p=0,008$ para el porcentaje de β -globulinas y $p=0,004$ para la concentración de estas globulinas). Las pruebas de contrastes intra-sujetos han mostrado que la diferencia estadística se encuentra entre los días 30 y 90, momento en el que se produce un incremento marcado de estas variables, como puede observarse en el gráfico 31. En cambio, los valores porcentual y absoluto de las β -globulinas plasmáticas no muestran diferencias estadísticamente significativas en función del momento del estudio en los perros con EMC del grupo 2 ($p=0,073$ en cuanto al porcentaje de β -globulinas y $p=0,104$ en cuanto a la concentración de estas globulinas).

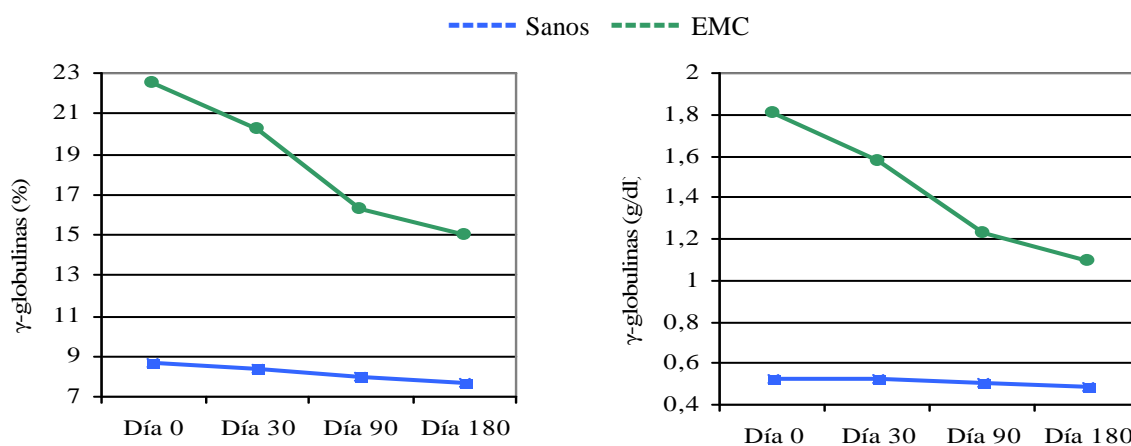
➤ γ -globulinas

Tabla 78: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de γ -globulinas plasmáticas en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	8,698	1,980	22,523	15,778	17,171	14,059
Día 30	8,350	1,505	20,283	13,468	15,663	12,024
Día 90	7,941	1,458	16,321	9,672	13,077	8,610
Día 180	7,700	1,714	15,030	9,860	12,192	8,520

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica	Media (g/dl)	Desviación típica
Día 0	0,521	0,107	1,804	1,567	1,307	1,371
Día 30	0,525	0,073	1,577	1,402	1,170	1,205
Día 90	0,505	0,106	1,230	0,847	0,949	0,751
Día 180	0,485	0,136	1,091	0,822	0,857	0,708

Gráfico 32: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de γ -globulinas plasmáticas en los perros de los grupos 1 y 2



El comportamiento a lo largo del tiempo del porcentaje de γ -globulinas así como la concentración de estas globulinas son similares en los perros sanos incluidos en el Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2, no habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución de estos parámetros entre ambas poblaciones ($p=0,078$ para la evolución del valor porcentual y $p=0,094$ para el valor absoluto).

El porcentaje de γ -globulinas sufre cambios estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% a lo largo del tiempo ($p=0,019$), habiéndose observado que estos cambios se producen entre el día 30 y el día 90, descendiendo este valor de forma marcada en los perros con EMC.

En cuanto a la evolución de la concentración de γ -globulinas, aunque existe una tendencia con el paso del tiempo hacia el descenso de este valor, tendencia que es más marcada en los perros del Grupo 2 (perros con EMC), las diferencias no alcanzan el grado de significación estadística ($p=0,061$).

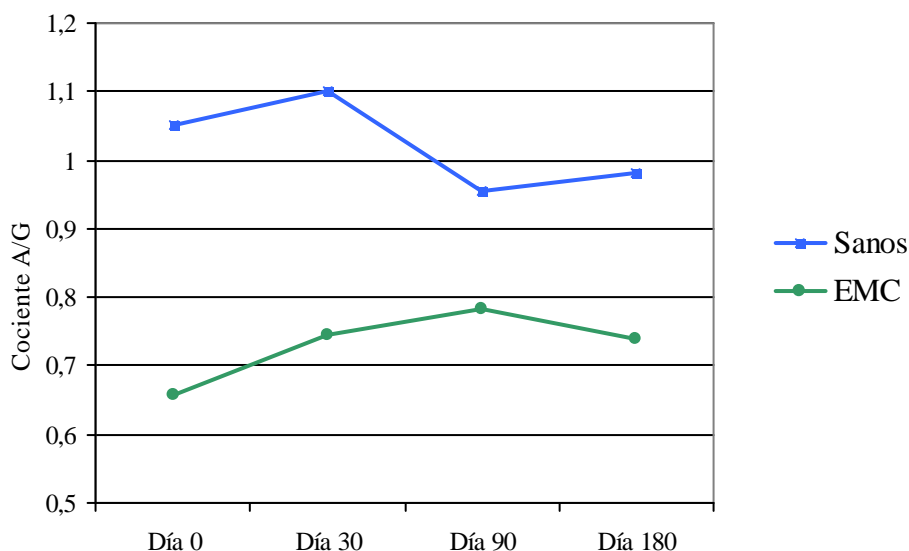
Por otra parte, se ha comprobado la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre los grupos 1 y 2 para el valor porcentual ($p=0,004$) y para el valor absoluto ($p=0,006$) de las γ -globulinas, siendo superiores en todo momento en los perros con EMC.

➤ Cociente Albúmina/Globulinas (A/G)

Tabla 79: Valores del cociente A/G en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC) en los diferentes controles realizados en el estudio

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica
Día 0	1,050	0,141	0,657	0,211	0,809	0,268
Día 30	1,100	0,124	0,746	0,260	0,883	0,277
Día 90	0,955	0,143	0,782	0,223	0,849	0,211
Día 180	0,982	0,263	0,737	0,246	0,832	0,277

Gráfico 33: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del cociente A/G en los perros de los grupos 1 y 2



Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la evolución en el tiempo del cociente A/G entre los perros sanos del grupo 1 y los perros con EMC del grupo 2 ($p=0,019$). Las pruebas de contrastes intra-sujetos muestran que la diferencia estadística se halla en la evolución de esta variable entre los días 30 y 90, momento en el que en los

perros sanos se produce un descenso del cociente A/G y en los perros con EMC se produce un incremento.

En los perros sanos del Grupo 1 no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en el cociente A/G entre los diferentes momentos del estudio ($p=0,122$), mientras que en el Grupo 2 se ha encontrado la existencia de cambios estadísticamente significativos de esta variable a lo largo del tiempo ($p=0,049$), observándose un incremento paulatino de este valor desde el día 0.

Por otra parte, existen diferencias estadísticamente significativas en el valor del cociente A/G entre los perros sanos y los perros con EMC, siendo superior el cociente en todo momento en los perros sanos ($p=0,000$ el día 0, $p=0,010$ el día 30, $p=0,029$ el día 90 y $p=0,014$ el día 180).

5.6.6. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DEL INMUNOFENOTIPO

A continuación se van a detallar los resultados obtenidos para las diferentes subpoblaciones linfocitarias analizadas en este estudio en los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) en los controles de los días 0, 30, 90 y 180. Las tablas 80-86 y los gráficos 34-40 reflejan estos resultados.

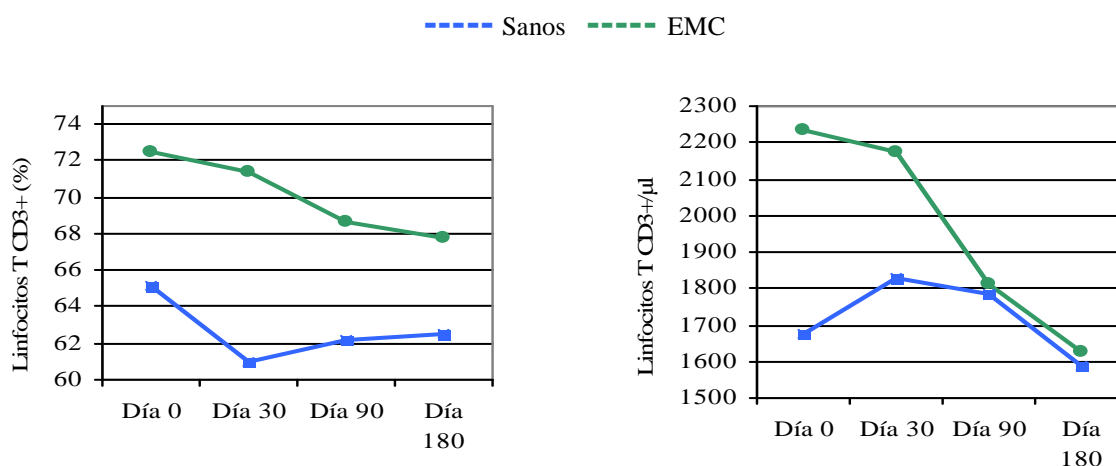
➤ Linfocitos T (CD3+)

Tabla 80: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de linfocitos T (CD3+) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	65,15	6,113	72,52	10,341	69,67	9,550
Día 30	60,94	7,000	71,38	9,310	67,34	9,834
Día 90	62,16	5,485	68,60	8,507	65,72	8,149
Día 180	62,47	6,161	67,78	8,717	69,67	9,550

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica
Día 0	1677,173	553,227	2236,945	1609,514	2020,259	1320,365
Día 30	1829,460	476,469	2173,663	1520,979	2040,423	1224,873
Día 90	1784,449	338,399	1810,439	1110,787	1800,378	884,569
Día 180	1588,790	373,812	1626,529	1231,471	1611,921	980,560

Gráfico 34: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de los linfocitos T (CD3+) en los perros de los grupos 1 y 2



No existen diferencias estadísticamente significativas al 95% en el comportamiento de la evolución en el tiempo del porcentaje ($p=0,216$) y del valor absoluto ($p=0,282$) de los linfocitos T (CD3+) en sangre periférica entre los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) del estudio, evolucionando estas variables de forma similar en ambas poblaciones.

El porcentaje de linfocitos T (CD3+) tiende a disminuir de modo significativo a lo largo del tiempo ($p=0,026$), destacando el descenso de este valor que se produce entre el día 0 y el día 30. En cambio, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el número de linfocitos T (CD3+) por microlitro de sangre entre los diferentes momentos del estudio ($p=0,112$). Sin embargo, se observa una tendencia hacia el descenso también para esta variable (gráfico 34), constante desde el inicio hasta el día 180 en el caso del grupo de perros con EMC y desde el día 30 hasta el día 180 en el grupo de perros sanos, en este caso tras un leve incremento entre los días 0 y 30.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el porcentaje de linfocitos T (CD3+) entre los grupos 1 y 2

($p=0,009$), siendo mayor en todos los momentos del estudio el valor de este porcentaje en la población de perros con EMC. Sin embargo, en el caso del recuento absoluto de estos linfocitos no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0,511$).

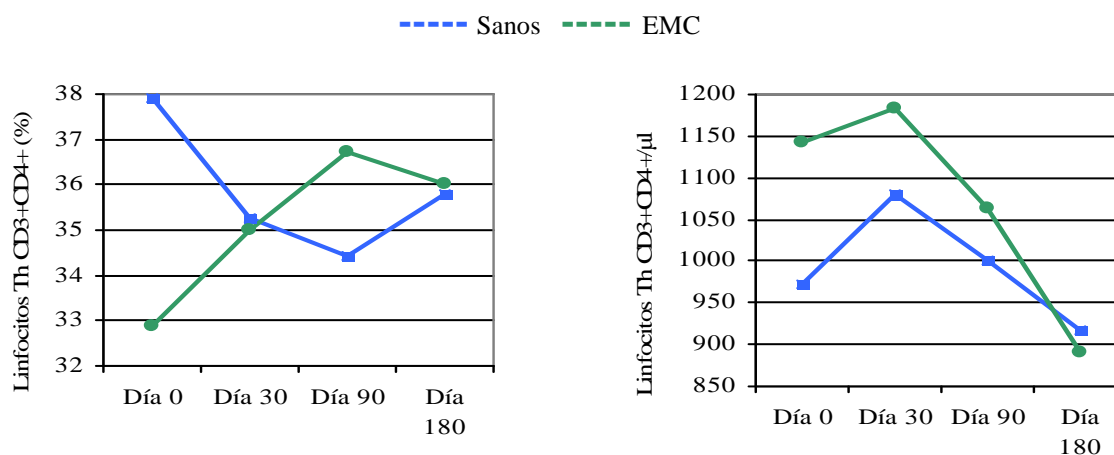
➤ Linfocitos Th (CD3+CD4+)

Tabla 81: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de linfocitos Th (CD3+CD4+) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	37,914	4,940	32,875	9,252	34,764	8,201
Día 30	35,273	6,230	35,010	8,276	35,108	7,468
Día 90	34,444	5,121	36,725	7,071	35,870	6,419
Día 180	35,775	4,983	36,026	7,665	35,932	6,696

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica
Día 0	971,760	437,965	1141,619	1173,454	1077,922	958,649
Día 30	1079,840	410,451	1183,791	1101,750	1144,809	897,980
Día 90	999,945	284,487	1064,143	750,111	1040,069	612,026
Día 180	917,961	268,599	890,644	544,677	900,888	455,645

Gráfico 35: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de los linfocitos Th (CD3+CD4+) en los perros de los grupos 1 y 2



Se ha comprobado la existencia de diferencias estadísticamente significativas al 95% en el comportamiento en el tiempo del porcentaje de linfocitos Th (CD3+CD4+) entre los perros sanos (Grupo 1) y los perros con EMC (Grupo 2) ($p=0,049$). La diferencia estadística se halla en el comportamiento de esta variable entre el día 0 y el día 30: en los perros sanos tiende a disminuir este porcentaje en este período de tiempo mientras que en los perros con EMC tiende a aumentar en el mismo período (gráfico 35).

Sin embargo, el valor porcentual de los linfocitos Th (CD3+CD4+) no ha mostrado cambios estadísticamente significativos al 95% a lo largo del tiempo ni en el grupo de perros sanos ($p=0,112$) ni en el grupo de perros con EMC ($p=0,170$).

La evolución en el tiempo del valor absoluto de los linfocitos Th (CD3+CD4+) es, sin embargo, similar entre las dos poblaciones caninas estudiadas, no habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre los grupos 1 y 2 ($p=0,544$).

Tampoco se han observado diferencias estadísticamente significativas al 95% para el valor absoluto de linfocitos Th (CD3+CD4+) entre los controles realizados ($p=0,102$).

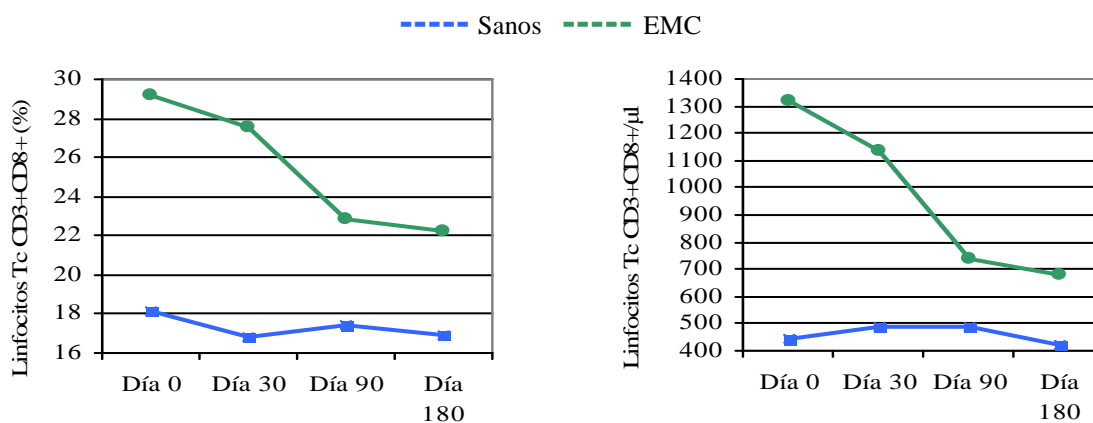
➤ Linfocitos Tc (CD3+CD8+)

Tabla 82: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de linfocitos Tc (CD3+CD8+) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	18,142	6,008	29,190	20,026	25,047	16,975
Día 30	16,780	4,947	27,588	17,962	23,535	15,320
Día 90	17,455	4,548	22,823	12,215	20,809	10,284
Día 180	16,882	5,532	22,184	12,385	20,196	10,567

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica
Día 0	440,681	111,457	1321,219	1795,963	991,017	1472,719
Día 30	486,115	122,124	1136,236	1473,650	892,440	1199,398
Día 90	490,037	112,660	739,001	894,010	645,639	713,698
Día 180	421,499	144,186	677,055	1021,752	581,221	814,269

Gráfico 36: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de los linfocitos Tc (CD3+CD8+) en los perros de los grupos 1 y 2



No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo de los valores porcentual ($p=0,149$) y absoluto ($p=0,161$) de los linfocitos Tc (CD3+CD8+) entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2, siguiendo, por tanto, estas variables un comportamiento similar en ambas poblaciones.

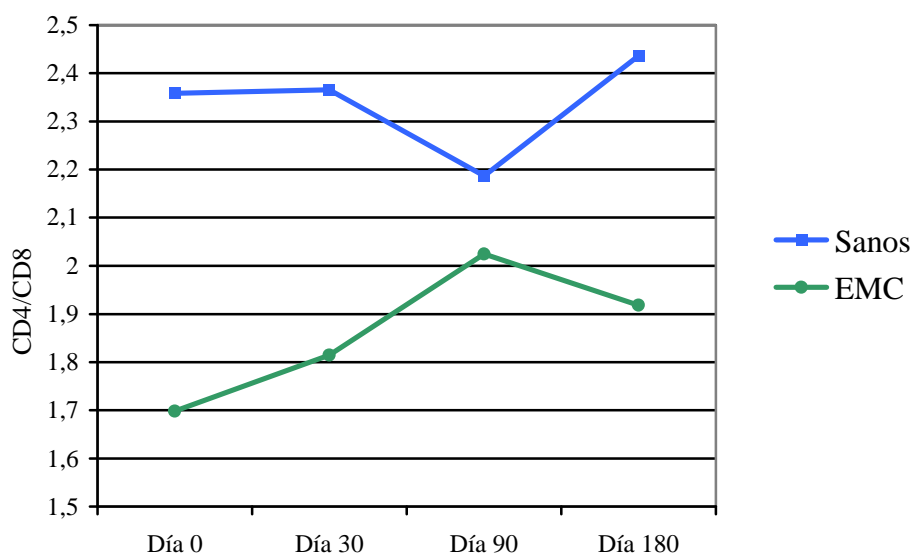
Asimismo, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas para estas variables entre los diferentes tiempos del estudio ($p=0,088$ en el caso del porcentaje de linfocitos Tc y $p=0,156$ en el caso del valor absoluto de estas células), no existiendo, por tanto, cambios significativos en estas variables a lo largo del tiempo. A pesar de no haberse encontrado una asociación estadística, en las tablas 82 A y B y el gráfico 36 puede observarse que tanto el valor relativo como el valor absoluto de los linfocitos Tc tienden a disminuir desde el comienzo del estudio, siendo más marcada esta tendencia en la población de perros con EMC.

➤ **Cociente CD4/CD8**

Tabla 83: Valores del cociente CD4/CD8 en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica
Día 0	2,358	0,972	1,698	1,072	1,945	1,070
Día 30	2,365	1,068	1,815	1,117	2,021	1,115
Día 90	2,186	0,945	2,024	1,139	2,085	1,058
Día 180	2,435	1,137	1,918	0,705	2,112	0,910

Gráfico 37: Representación gráfica de la evolución en el tiempo del cociente CD4/CD8 en los perros de los grupos 1 y 2



El estudio estadístico de los datos no ha mostrado la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento en el tiempo del valor del cociente CD4/CD8 entre los perros sanos y los perros con EMC ($p=0,135$).

Tampoco se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el cociente CD4/CD8 entre los diferentes momentos del estudio ($p=0,561$), aunque parece tender a aumentar este valor en el caso de los perros con EMC (tabla 83 y gráfico 37).

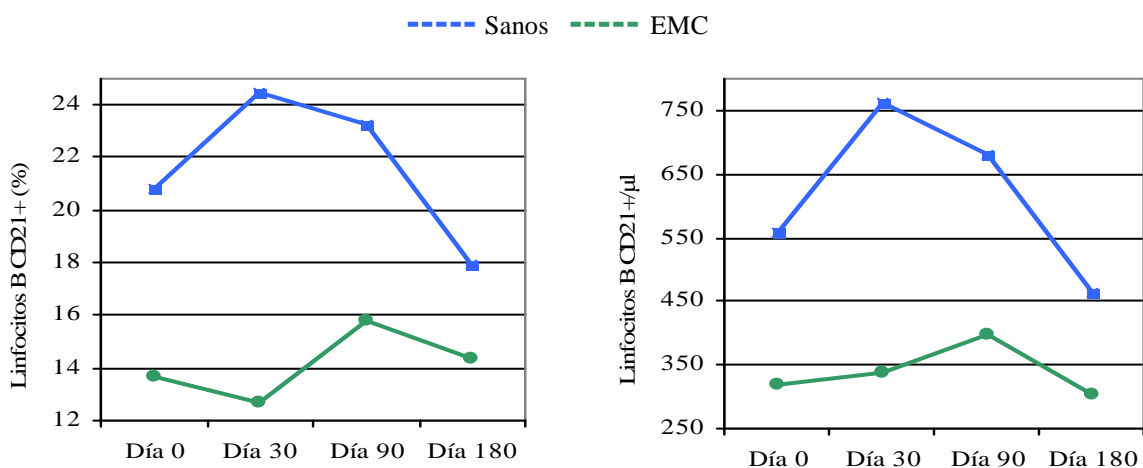
➤ **Linfocitos B (CD21+)**

Tabla 84: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de linfocitos B (CD21+) en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	20,823	5,432	13,636	8,568	16,331	8,244
Día 30	24,504	6,956	12,722	7,237	17,140	9,102
Día 90	23,289	4,638	15,831	6,572	18,627	6,896
Día 180	17,911	4,362	14,365	6,734	15,695	6,131

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica
Día 0	559,002	289,775	318,219	189,426	408,513	256,543
Día 30	762,418	327,173	338,942	176,484	497,745	316,953
Día 90	679,365	211,655	398,951	217,649	504,106	252,891
Día 180	463,478	179,316	304,652	165,669	364,212	185,295

Gráfico 38: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de los linfocitos B (CD21+) en los perros de los grupos 1 y 2



El comportamiento a lo largo del tiempo del porcentaje de linfocitos B (CD21+) y del número de estas células por microlitro de sangre periférica presenta diferencias estadísticamente significativas al 95% entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2 ($p=0,001$ para la evolución del valor porcentual y $p=0,001$ para la evolución del valor absoluto).

En el caso de la evolución del porcentaje de linfocitos B, las pruebas de contrastes intra-sujetos muestran que la diferencia estadística se encuentra en la evolución de esta variable entre los días 30 y 90, momento en el que este porcentaje tiende a disminuir en los perros sanos y a aumentar en los perros con EMC, y entre los días 90 y 180, período de tiempo en el que se produce un descenso de este valor en ambos grupos, pero es mucho más marcado en los perros sanos.

En cuanto a la evolución del valor absoluto de los linfocitos B, la diferencia estadística se halla entre los días 0 y 30, período en el que se produce un incremento muy marcado del número de linfocitos B en sangre en los perros sanos y muy leve en los perros con EMC, y entre el día 30 y el día 90, donde se produce un descenso de este parámetro en el caso de los perros sanos y un incremento en los perros con EMC.

En el caso de los perros del Grupo 1 (perros sanos) se ha encontrado la existencia de diferencias estadísticamente significativas al 95% tanto en el valor porcentual ($p=0,002$) como en el valor absoluto ($p=0,002$) de los linfocitos B (CD21+) en los diferentes momentos del estudio, encontrándose un aumento del mismo entre los días 0 y 30, y un descenso posterior hasta el día 180.

En los perros con EMC del Grupo 2 no se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el porcentaje de linfocitos B (CD21+) en los diferentes momentos del estudio ($p=0,079$). Sin embargo, el número de estas células por microlitro de sangre periférica sí ha mostrado cambios a lo largo del tiempo que son estadísticamente significativos al 95% ($p=0,036$), produciéndose un incremento de este valor hasta el día 90 y un descenso entre los días 90 y 180.

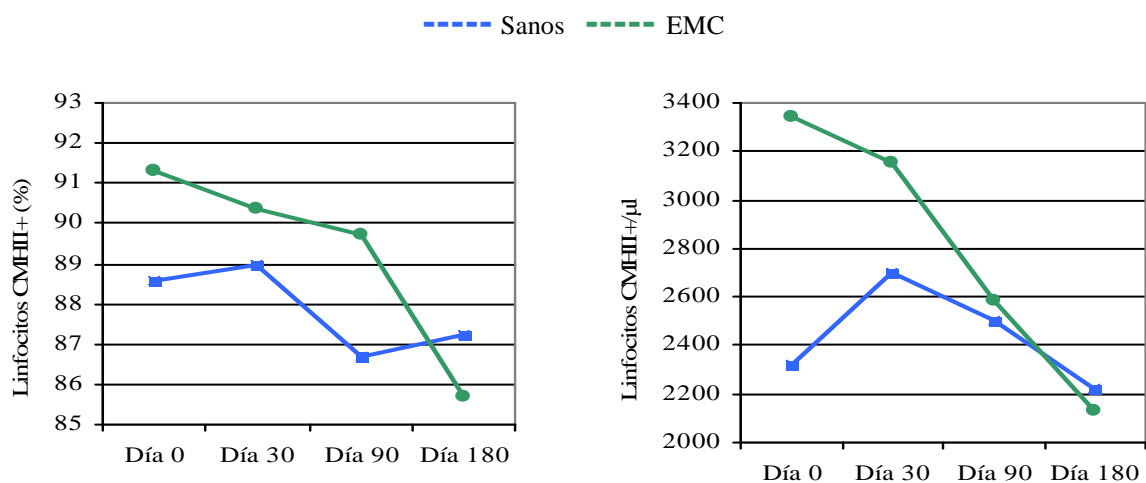
➤ **Linfocitos CMHII+**

Tabla 85: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de linfocitos CMHII+ en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	88,56	5,442	91,29	5,891	90,23	5,788
Día 30	88,98	3,433	90,36	6,533	89,83	5,513
Día 90	86,70	6,437	89,70	4,430	88,54	5,402
Día 180	87,23	4,917	85,72	7,362	86,31	6,476

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica
Día 0	2323,603	911,220	3343,222	3177,837	2948,531	2572,648
Día 30	2701,418	731,488	3153,339	2736,136	2978,402	2176,724
Día 90	2499,143	533,598	2582,799	1752,809	2550,416	1396,252
Día 180	2220,797	494,360	2130,823	1457,980	2165,652	1169,195

Gráfico 39: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de los linfocitos CMHII+ en los perros de los grupos 1 y 2



No existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el comportamiento de los valores porcentual ($p=0,259$) y absoluto ($p=0,180$) de los linfocitos CMHII+ a lo largo del tiempo entre los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) del estudio.

Se han encontrado cambios estadísticamente significativos al 95% en el porcentaje de linfocitos CMHII+ a lo largo del tiempo ($p=0,035$), produciéndose un descenso estadísticamente significativo entre el día 0 y el día 180, de forma progresiva. El valor absoluto de linfocitos CMHII+ no presenta cambios a lo largo del tiempo estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% ($p=0,055$), si bien las diferencias que se encuentran en este parámetro entre los diferentes momentos del estudio son cercanas a la significación, observándose, al igual que para el valor porcentual, una tendencia hacia el descenso en esta variable.

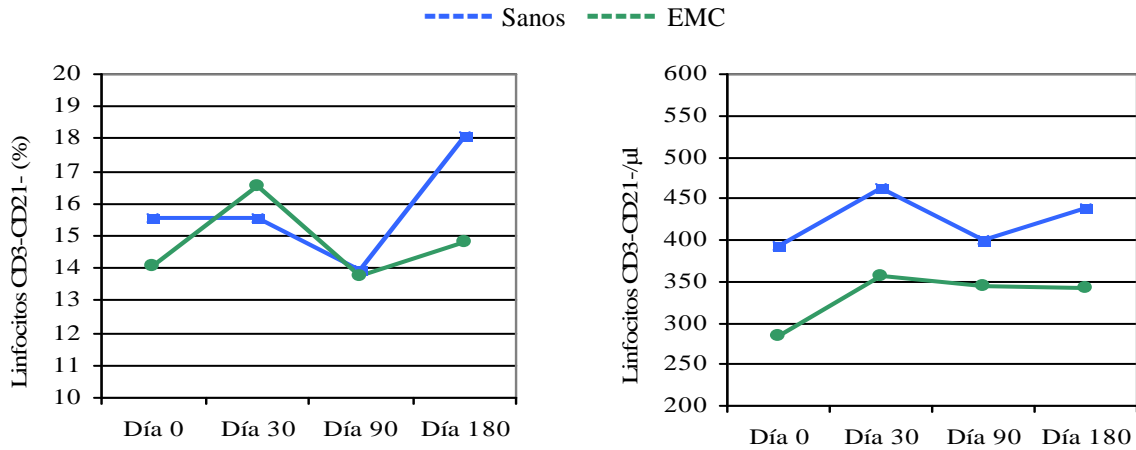
➤ Linfocitos CD3-CD21-

Tabla 86: Valores porcentuales (A) y absolutos (B) de linfocitos CD3-CD21- en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

A:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica	Media (%)	Desviación típica
Día 0	15,559	6,027	14,053	15,703	14,636	12,721
Día 30	15,534	5,707	16,553	14,770	16,158	11,962
Día 90	13,944	4,841	13,773	5,332	13,839	5,065
Día 180	18,057	8,510	14,820	5,984	16,073	7,114

B:	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica	Media/ μ l	Desviación típica
Día 0	392,515	187,687	283,631	164,797	325,780	179,214
Día 30	462,360	199,106	356,477	184,613	397,464	194,252
Día 90	400,698	153,224	345,519	111,645	366,879	129,745
Día 180	438,972	201,929	342,148	148,152	379,629	174,409

Gráfico 40: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores porcentuales (izquierda) y absolutos (derecha) de los linfocitos CD3-CD21- en los perros de los grupos 1 y 2



No se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el comportamiento a lo largo del tiempo del porcentaje y del valor absoluto de los linfocitos CD3-CD21- entre los grupos 1 (perros sanos) y 2 (perros con EMC) del estudio ($p=0,650$ en el caso de la evolución del valor porcentual y $p=0,829$ en el caso de la evolución del valor absoluto de los linfocitos CD3-CD21-).

Tampoco se han producido cambios estadísticamente significativos al 95% ni del porcentaje ($p=0,520$) ni del número de linfocitos CD3-CD21-/ μl ($p=0,239$) a lo largo del tiempo.

5.6.7. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE IFN- γ , IL-6, IL-10 Y TNF-A

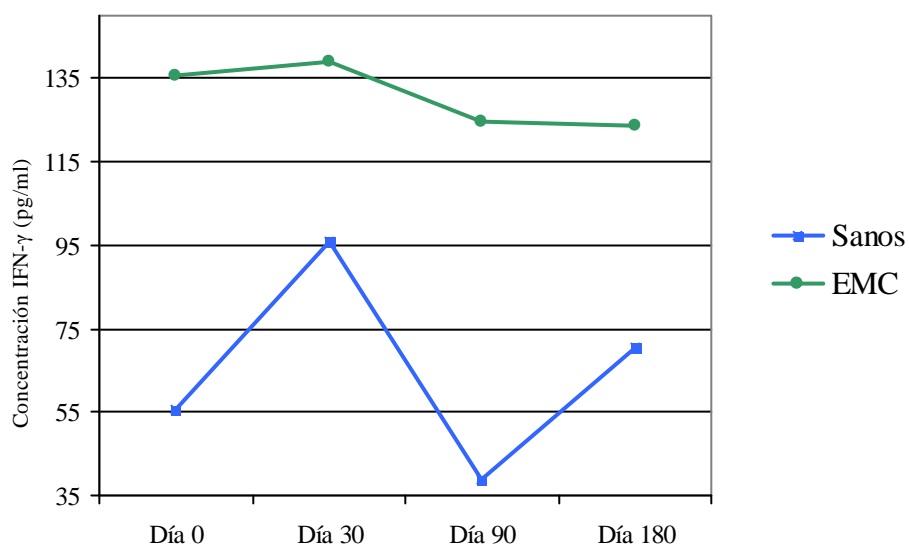
En las tablas 87-90 y en los gráficos 41-44 se muestran los resultados obtenidos de la concentración de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α .

➤ IFN- γ

Tabla 87: Valores de la concentración de IFN- γ en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (pg/ml)	Desviación típica	Media (pg/ml)	Desviación típica	Media (pg/ml)	Desviación típica
Día 0	55,440	37,351	135,678	284,372	107,206	230,660
Día 30	95,881	90,697	139,073	416,732	123,747	336,410
Día 90	38,885	42,560	124,738	290,554	94,274	236,251
Día 180	70,454	70,140	123,427	231,985	104,630	190,756

Gráfico 41: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores de la concentración de IFN- γ en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC)



El valor de la concentración de IFN- γ en el plasma sigue un comportamiento similar a lo largo del tiempo en las dos poblaciones caninas estudiadas, no habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en la evolución en el tiempo de este parámetro entre los grupos 1 y 2 ($p=0,945$).

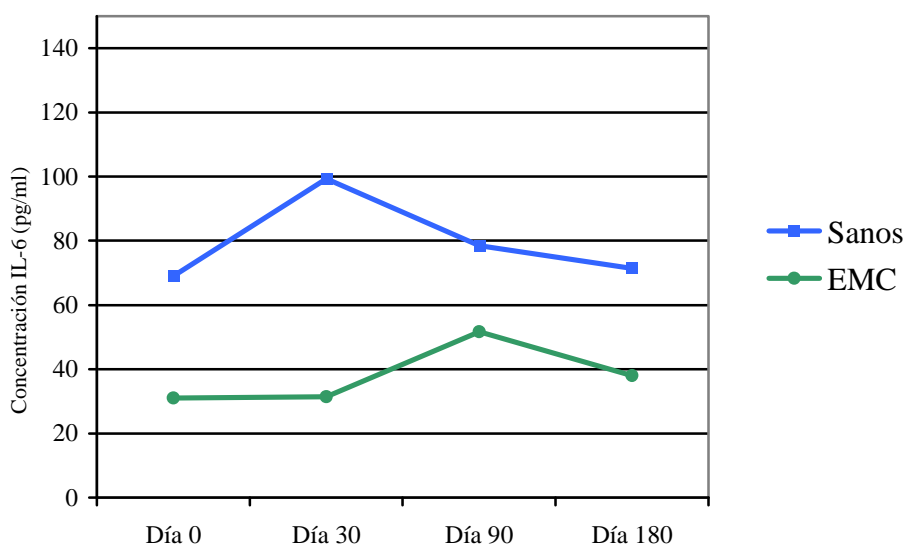
Los valores de la concentración de IFN- γ tampoco han mostrado cambios estadísticamente significativos a lo largo de los diferentes tiempos del estudio ($p=0,892$), observándose escasas modificaciones de esta variable a lo largo del tiempo.

➤ IL-6

Tabla 88: Valores de la concentración de IL-6 en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (pg/ml)	Desviación típica	Media (pg/ml)	Desviación típica	Media (pg/ml)	Desviación típica
Día 0	69,041	27,571	31,078	33,792	44,219	36,240
Día 30	99,285	112,604	31,479	28,228	54,951	75,164
Día 90	78,421	56,035	51,713	57,578	60,958	57,397
Día 180	71,481	29,913	38,053	54,419	49,624	49,444

Gráfico 42: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores de la concentración de IL-6 en los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2



El estudio estadístico de los datos ha revelado que no existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en el comportamiento de la evolución de la concentración de IL-6 entre los grupos 1 y 2 del estudio ($p=0,462$).

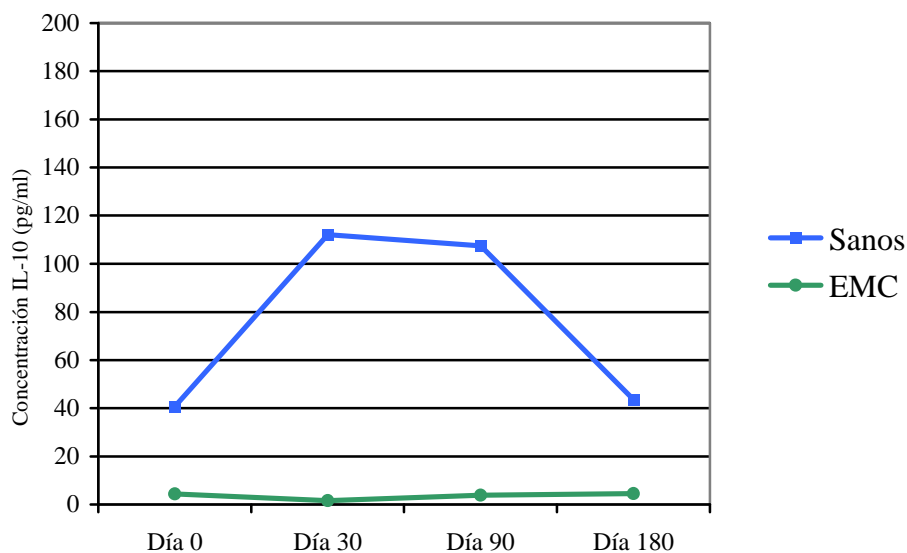
Tampoco se han encontrado cambios en la concentración de IL-6 a lo largo del tiempo que sean estadísticamente significativos al 95% ($p=0,584$).

➤ IL-10

Tabla 89: Valores de la concentración de IL-10 en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (pg/ml)	Desviación típica	Media (pg/ml)	Desviación típica	Media (pg/ml)	Desviación típica
Día 0	40,78	140,357	4,40	9,188	19,99	91,700
Día 30	112,03	388,072	1,57	3,811	48,91	253,893
Día 90	107,32	370,651	3,84	13,999	48,19	242,485
Día 180	43,71	151,412	4,50	13,229	21,31	99,135

Gráfico 43: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores de la concentración de IL-10 en los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo



A pesar de las diferencias que pueden observarse en la tabla 89 y en el gráfico 43 en cuanto a la evolución en el tiempo de la concentración plasmática de IL-10 entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC del Grupo 2 ($p=0,245$), dichas diferencias no han resultado ser estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%,

siguiendo, por tanto, estas variables un comportamiento estadísticamente similar en ambas poblaciones.

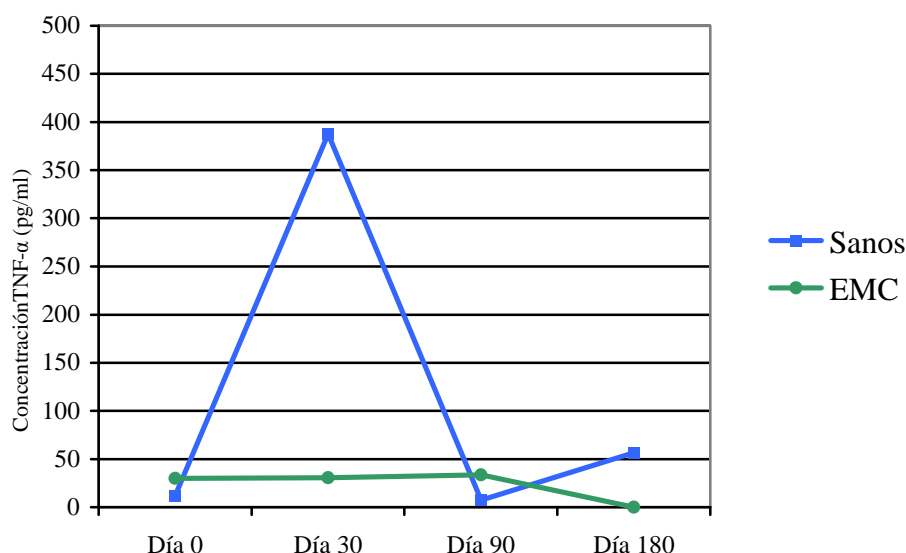
Asimismo, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas para esta variable entre los diferentes tiempos del estudio ($p=0,270$), no existiendo, por tanto, cambios significativos a lo largo del tiempo.

➤ **TNF- α**

Tabla 90: Valores de la concentración de TNF- α en los perros sanos del Grupo 1 y en los perros con EMC del Grupo 2 antes (día 0) y después (días 30, 90 y 180) de la administración de doxiciclina

	Grupo 1 (sanos)		Grupo 2 (EMC)		Total	
	Media (pg/ml)	Desviación típica	Media (pg/ml)	Desviación típica	Media (pg/ml)	Desviación típica
Día 0	11,818	15,523	30,105	54,682	23,168	44,532
Día 30	387,394	417,146	30,564	46,474	165,914	307,418
Día 90	7,459	17,286	33,553	39,653	23,656	35,0348
Día 180	56,533	84,338	0,100	0,293	21,506	57,592

Gráfico 44: Representación gráfica de la evolución en el tiempo de los valores de la concentración de TNF- α en los perros de los grupos 1 (sanos) y 2 (con EMC)



El comportamiento de la evolución de la concentración de TNF- α en el tiempo es estadísticamente diferente al 95% entre los perros sanos del Grupo 1 y los perros con EMC

del Grupo 2 ($p=0,001$). En concreto, las pruebas de contraste intra-sujeto han mostrado que las diferencias se encuentran en el comportamiento de la concentración de esta citocina entre los días: 0 y 30 ($p=0,001$), momento en el que en los perros sanos se produce un incremento muy marcado de este valor, permaneciendo en los perros con EMC casi sin variación; 30 y 90 ($p=0,001$), período en el que desciende de forma marcada en los perros sanos y permanece, de nuevo, prácticamente sin variación en los perros con EMC; y 90 y 180 ($p=0,002$), momento en el que este valor aumenta en los perros sanos y desciende en los perros con EMC.

En la población de perros sanos del Grupo 1 del estudio se producen cambios estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% en la concentración de TNF- α a lo largo del tiempo ($p=0,013$), siendo estos cambios más marcados entre los días 0 y 30 y entre los días 30 y 90, como puede observarse en la tabla 90 y en el gráfico 44.

En la población de perros con EMC del Grupo 2 no se producen cambios estadísticamente significativos al 95% en el valor de la concentración de TNF- α a lo largo del tiempo ($p=0,061$).

6. DISCUSIÓN

6.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS

Como se ha comentado previamente, los objetivos de este trabajo requerían comenzar llevando a cabo una caracterización de las poblaciones linfocitarias caninas, estableciendo unos valores de referencia propios para esta especie que nos pudiesen servir de orientación en la posterior evaluación del inmunofenotipo en los perros con EMC y con otras patologías. Para ello, se ha contado con un total de 47 perros considerados sanos en base a la ausencia de sintomatología clínica, de anomalías en la exploración física y de alteraciones en la analítica sanguínea completa, unido a la negatividad mediante IFI y PCR frente a *E. canis* y *L. infantum*, dos de los patógenos más habituales en la especie canina en nuestro entorno (Sainz et al. 1998, Miró et al. 2007).

La población estudiada es homogénea desde el punto de vista del sexo, siendo aproximadamente la mitad de los animales machos y la otra mitad hembras. En cuanto a su edad, se decidió establecer tres grupos basados en las descripciones de otros autores en la bibliografía (Byrne et al. 2000, Strasser et al. 2000, Faldyna et al. 2001, HogenEsch et al. 2004, Blount et al. 2005, Horiuchi et al. 2007b). Más de la mitad de los animales sanos (26 perros) fueron considerados adultos (de 4 a 8 años de edad), siendo los restantes 21 animales en un 23,40% menores de 1 año y en un 21,27% perros jóvenes (de más de 1 año hasta 3,5 años). Desafortunadamente no se han podido incluir perros geriátricos en esta población de perros sanos, ya que la mayoría de los perros de edad avanzada atendidos presentaban alteraciones en la exploración física y/o en la analítica sanguínea. Como se describió en el apartado de resultados, las razas más representadas en nuestra población canina sana han sido Beagle (13 perros), Galgo Español (13 perros) y Pastor Alemán (11 perros).

6.1.1. DATOS ANALÍTICOS DE LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS

6.1.1.1. Analítica sanguínea

Los resultados medios e intervalos de confianza obtenidos en el estudio hematológico, en la bioquímica sanguínea básica y en el proteinograma de la población de perros sanos muestran unos valores dentro del rango de referencia para la especie canina. Aún teniendo en cuenta las limitaciones derivadas del tamaño muestral, consideramos que nuestra población canina sana presenta unas características respecto a estas variables que son extrapolables a otras poblaciones de perros sanos y que nos sirven de referencia en

nuestros estudios posteriores de comparación de las poblaciones de perros con EMC y con otras patologías, así como en la evaluación del efecto de la administración de doxiciclina en la especie canina. Dichas comparaciones se realizaron empleando métodos paramétricos siempre que los valores se adaptasen a una distribución normal y métodos no paramétricos en caso contrario.

6.1.1.2. Inmunofenotipo

El empleo de la citometría de flujo en el inmunofenotipado en la medicina clínica (tanto humana como veterinaria) permite determinar los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos y, así, analizar el impacto de las enfermedades sobre el sistema inmunitario, definir clínicamente los estados de enfermedad y establecer el pronóstico (Byrne et al. 2000, Reis et al. 2005). Sin embargo, para que esto sea posible, es imprescindible disponer de una técnica estandarizada que permita establecer unos valores fisiológicos que sirvan de referencia para poder identificar alteraciones en la distribución de estas poblaciones celulares.

Uno de los objetivos descritos al inicio de este proyecto fue el establecimiento de unos valores porcentuales y absolutos de referencia para el inmunofenotipo en la especie canina mediante el empleo de citometría de flujo a través del marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-células B y anti-CMH de clase II. Con esta finalidad, se llevó a cabo un estudio del fenotipo de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de un total de 47 perros sanos, obteniéndose los resultados descritos en el apartado anterior. Dichos resultados nos han permitido disponer de unos rangos de referencia para la posterior comparación con los valores obtenidos para los perros con EMC y con otras patologías.

Mientras en medicina humana la citometría de flujo se emplea en muchos laboratorios de análisis clínicos de forma rutinaria, habiéndose establecido una metodología claramente definida para determinar de forma rápida diversas poblaciones celulares en una gran variedad de fluidos biológicos (Reis et al. 2005), en medicina veterinaria la aplicación de la citometría de flujo ha sido mucho menos difundida. Esto se debe en parte a que el desarrollo de esta técnica en la especie canina se ha visto limitado por la escasa disponibilidad comercial de reactivos, debiendo llevarse a cabo los estudios de inmunofenotipado durante mucho tiempo mediante el empleo de anticuerpos monoclonales cedidos por otros investigadores (Byrne et al. 2000) o bien mediante el empleo de los anticuerpos disponibles frente a antígenos de otras especies animales y del hombre con los que presentaban reactividad cruzada (Williams 1997, Schuberth et al. 1998, Sinkora et al. 2007). Un evento clave en la evaluación de las subpoblaciones

linfocitarias caninas por citometría de flujo fue el encuentro del “Canine Leukocyte Antigen Workshop” (CLAW) en julio de 1993, cuyos hallazgos fueron publicados en 1994 por Cobbold y Metcalfe y que permitió la identificación de moléculas CD de perro y el desarrollo por parte de diversos investigadores de anticuerpos monoclonales específicos para la especie canina (Cobbold & Metcalfe 1994). Esto ha hecho que en la actualidad se disponga de una amplia batería de anticuerpos monoclonales frente a diversos antígenos caninos, aunque aún es muy inferior a la existente para otras especies, como el hombre o el ratón. Por otra parte, la aplicación de la citometría de flujo al inmunofenotipado en el diagnóstico veterinario se ha visto limitada por la falta de una estandarización de la técnica y por la ausencia de unos rangos de referencia para las diferentes subpoblaciones linfocitarias (Byrne et al. 2000).

El número de estudios con los que se han tratado de solucionar estos problemas mediante la descripción de protocolos y el establecimiento de unos valores de referencia en perros sanos para los valores porcentuales y/o absolutos de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica es aún muy escaso (Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, Reis et al. 2005). Son más numerosos los trabajos en los que se describen los valores del inmunofenotipo obtenidos en un grupo reducido de perros sanos (o grupo control) únicamente para poder compararlos con los resultados del estudio llevado a cabo en diversas patologías o en diferentes tejidos (Chabanne et al. 1995, Caswell et al. 1997, Winnicka et al. 2002, Sakai et al. 2003). Los anticuerpos monoclonales empleados en estos estudios para el marcaje de linfocitos T han sido anti-CD3, anti-CD5 y/o anti-Thy-1, entre otros, según el trabajo. En el caso del marcaje de linfocitos Th, se ha utilizado, al igual que en nuestro trabajo, el anticuerpo anti-CD4, usándose el anti-CD8 para la identificación de linfocitos Tc. La caracterización de los linfocitos B se ha realizado habitualmente mediante el marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD21 y, en algunos casos, se ha determinado el porcentaje de linfocitos sanguíneos que expresaban en su superficie CMH de clase II, como en nuestro estudio. En la Tabla 91 se muestran, a modo de resumen, los resultados de la distribución de las subpoblaciones linfocitarias encontradas en nuestro trabajo y en los diferentes estudios publicados previamente.

Tal y como se describió en el apartado de resultados de la presente memoria, en nuestra población de perros sanos de diferentes razas y edades, se obtuvieron unos resultados medios de 65,69% de linfocitos T y de 1869,25 de estas células por microlitro de sangre periférica. Los valores porcentuales de esta población linfocitaria en sangre periférica en perros sanos recogidos en la bibliografía varían entre un 61,56% y un 85,4% (Tabla 91), resultando nuestro valor inferior al obtenido en la mayoría de los estudios (Chabanne et al. 1995, Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, Sakai et al. 2003, Reis et al.

Tabla 91: Resultados obtenidos en nuestro estudio y en trabajos relacionados para las subpoblaciones linfocitarias sanguíneas caninas. Se indica el antígeno leucocitario empleado así como ciertas características de la población canina estudiada en cada caso, como el número de animales y su raza.

	Antígeno leucocitario	Nuestros resultados	Chabanne et al., 1995	Caswell et al., 1997	Byrne et al, 2000	Faldyna et al., 2001	Winnicka et al., 2002	Sakai et al., 2003	Reis et al., 2005
Linfocitos T	CD3	65,69% (1869,25/ μ l)	_____	_____	_____	80%	_____	85,4%	_____
	CD5	_____	82,8% (1670/ μ l)	_____	83,3%	_____	61,56% (1220/ μ l)	_____	81,7%
	Thy-1 u otros	_____	63,5 % (1440/ μ l)	69,6% (1720/ μ l)	_____	_____	_____	_____	84,9%
Linfocitos Th	CD4	37,91% (1080,14/ μ l)	47,5% (950/ μ l)	35% (840/ μ l)	45%	43,2%	40,77% (810/ μ l)	42,3%	46,04%
Linfocitos Tc	CD8	19,75% (506,19/ μ l)	19,3% (380/ μ l)	14,6% (380/ μ l)	28,8%	19,1%	26,44% (540/ μ l)	26,3%	32,08%
Cociente CD4/CD8	CD4 y CD8	2,09	2,6	2,8	1,87	2,5	1,73	1,64	_____
Linfocitos B	CD21	18,41% (527,57/ μ l)	12,2% (240/ μ l)	28,7% (730/ μ l)	12,9%	14,4%	5,12% (100/ μ l)	9,3%	19,8%
CMH clase II	CMHII	89,01% (2538,80/ μ l)	_____	_____	76,5%	_____	_____	_____	_____
Número de perros		47 (varias razas)	12 (Pastores alemanes)	5 (desconocido)	28 (Beagles)	54 (varias razas)	24 (varias razas)	11 (Beagle)	40 (mestizos)

2005). Sin embargo, no en todos los trabajos se han reflejado los valores absolutos obtenidos para las diferentes subpoblaciones linfocitarias, variando en los que se han descrito entre 1220 y 1720 linfocitos T/ μ l (Tabla 91), lo que resulta inferior a lo hallado en esta tesis doctoral. En este punto consideramos importante recalcar que, tal y como apuntaron Blount y colaboradores en 2005, sería recomendable calcular en todos los casos los valores absolutos de las poblaciones celulares y evitar hacer comparaciones únicamente de los valores porcentuales, ya que estos porcentajes se encuentran influenciados por los resultados de las demás poblaciones celulares de la muestra (Blount et al. 2005). Por otra parte, sería importante tener en cuenta que en nuestro estudio, en la caracterización de la población de células T, se ha empleado un anticuerpo monoclonal que reconoce de forma específica el antígeno canino CD3, mientras que en otros de los trabajos se ha empleado como antígeno leucocitario a identificar para caracterizar los linfocitos T CD5 o Thy-1 (Chabanne et al. 1995, Caswell et al. 1997, Byrne et al. 2000, Winnicka et al. 2002, Reis et al. 2005), a lo que se puede achacar, al menos en parte, algunas de las diferencias que hemos observado con nuestros resultados. Se ha descrito que los anticuerpos monoclonales anti-CD5 identifican en el hombre y en el ratón una subpoblación de células B, además de los linfocitos T. En el caso del perro, la expresión de la molécula CD5 de 67kDa se limita, según algunos autores, a las células T, y es posible que a algunas células NK (Williams 1997), aunque otros autores consideran que también se expresa en algunas células B (Byrne et al. 2000). El antígeno denominado Thy-1 se expresa, además de sobre la superficie de los linfocitos T, sobre otros tipos celulares, como monocitos y granulocitos, y resulta ser mucho menos específico que los demás antígenos empleados en la identificación de esta población (Williams 1997). En cambio, el antígeno de superficie CD3 es considerado la molécula de reconocimiento de células T más específica (Williams 1997), por lo que se decidió su empleo en esta tesis doctoral. Además, el menor porcentaje de linfocitos T CD3+ obtenido en nuestro estudio en comparación con el obtenido en otros trabajos en los que se han empleado anticuerpos monoclonales anti-CD3 puede deberse a diferencias en el clon y/o fuente de los anticuerpos, a diferencias en la raza o edad de los animales evaluados y a la metodología empleada en cada uno de los estudios.

En cuanto a la subpoblación linfocitaria Th, tanto en nuestro trabajo como en la mayoría de los estudios realizados al respecto (Dirscherl et al. 1995, Chabanne et al. 1995, Caswell et al. 1997, Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, Winnicka et al. 2002, Sakai et al. 2003, HogenEsch et al. 2004, Blount et al. 2005, Reis et al. 2005), se han empleado anticuerpos monoclonales capaces de identificar la molécula de superficie CD4. En la población de perros sanos de nuestro estudio se han obtenido unas medias similares a las de los trabajos previos (Tabla 91), aunque cabe destacar que, de la misma forma que se describió en el caso de los linfocitos T, nuestros resultados porcentuales para la población linfocitaria Th (37,91%) son algo inferiores a los obtenidos en la mayoría de los citados

trabajos (Chabanne et al. 1995, Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, Winnicka et al. 2002, Sakai et al. 2003, Reis et al. 2005), en los que este porcentaje varía entre 35 y 47,5%, siendo, en cambio, los valores absolutos algo superiores en este estudio (1080,14 linfocitos Th/ μ l) en comparación con los resultados reflejados en la bibliografía, variando este valor medio en los trabajos de otros autores entre 810 y 950/ μ l (Chabanne et al. 1995, Caswell et al. 1997, Winnicka et al. 2002).

Las medias del porcentaje y del valor absoluto de las células Tc CD8+ en sangre periférica de los perros sanos incluidos en nuestro estudio también mostraron resultados similares a los descritos previamente en la bibliografía por algunos autores (Chabanne et al. 1995, Caswell et al. 1997, Faldyna et al. 2001), como se puede comprobar en la Tabla 91. Sin embargo, otros grupos de investigación han obtenido valores porcentuales para esta población linfocitaria que son superiores a los hallados en nuestro estudio, de 26,3% a 32,08% (Byrne et al. 2000, Winnicka et al. 2002, Sakai et al. 2003, Reis et al. 2005), si bien el recuento absoluto descrito por aquellos autores que lo han incluido en su trabajo es sólo ligeramente superior al obtenido por nosotros en este trabajo (Winnicka et al. 2002). La molécula de superficie identificada en todos los casos para la caracterización de la subpoblación de linfocitos Tc ha sido CD8, por lo que las diferencias observadas en la bibliografía y en esta tesis doctoral pueden venir dadas por diferencias en el clon y la fuente de los anticuerpos empleados, la metodología y/o a las características propias de las poblaciones caninas estudiadas en cada trabajo.

El cociente CD4/CD8 ofrece información sobre la relación de las dos subpoblaciones linfocitarias T anteriormente mencionadas: Th y Tc. Los valores de este cociente descritos en la bibliografía varían entre 1,73 y 2,8 (Chabanne et al. 1995, Caswell et al. 1997, Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, Winnicka et al. 2002, Sakai et al. 2003, Reis et al. 2005). Nuestro resultado (de 2,09, como se describió en el apartado anterior) se encuentra dentro de este rango y representa aproximadamente el valor medio obtenido en dichos estudios.

La población linfocitaria B CD21+ es la que presenta una mayor variabilidad de resultados en los estudios publicados, habiéndose descrito valores porcentuales y absolutos de linfocitos B CD21+ en poblaciones caninas sanas desde 5,12 hasta 28,7% y desde 100 hasta 730/ μ l, respectivamente (Chabanne et al. 1995, Caswell et al. 1997, Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, Winnicka et al. 2002, Sakai et al. 2003, Reis et al. 2005). En los 47 perros sanos de este estudio los valores medios obtenidos para esta población linfocitaria son de 18,41% y 527,57/ μ l, encontrándose en un término medio entre los resultados publicados en la bibliografía. Una vez más, las diferencias encontradas para esta población linfocitaria entre los diversos trabajos pueden venir dadas por diferencias en la

metodología empleada, en las características de los anticuerpos utilizados o en las características de las propias muestras analizadas.

A diferencia de lo descrito en el hombre, la expresión de CMH de clase II en los linfocitos caninos se produce en un elevado número de células sin necesidad de la existencia de una activación previa (Cobbold & Metcalfe 1994, Dirscherl et al. 1995, Williams 1997, Schuberth et al. 1998, Byrne et al. 2000). En nuestro estudio, 2538,80 linfocitos/ μ l de media expresan estas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en los perros sanos, lo que representa el 89,01% de los linfocitos sanguíneos. Byrne y colaboradores en 2000 describieron una media de 76,5% de linfocitos CMHII+ en una de las poblaciones de perros sanos de su estudio, aunque los autores destacaban la existencia de una elevada variabilidad, con un rango entre 46,5% y 98,6%, una desviación estándar de 17,2 y un intervalo de confianza para el 95% de 70,2-82,9%, existiendo una clara división en función de la procedencia de los animales. En nuestro estudio, la desviación típica es de 5,20 y los límites inferior y superior para un intervalo de confianza para la media al 95% son 87,45% y 90,57%, respectivamente, para los valores porcentuales de linfocitos CMHII+, lo que refleja una variabilidad muy inferior a la hallada por Byrne y colaboradores. Estudios previos al publicado por Byrne y colaboradores muestran medias semejantes a la obtenida por nosotros, que varían entre el 80 y el 94% (Dirscherl et al. 1995, Schuberth et al. 1998).

En resumen, las diferencias observadas en los recuentos de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en las poblaciones caninas sanas de nuestro trabajo y de los trabajos que han sido publicados en la bibliografía pueden deberse a varios factores, como se ha descrito brevemente en el caso de los linfocitos T y B. Entre estos factores que conducen a la existencia de diferencias en los resultados del inmunofenotipado obtenidos por diversos autores se encuentran: diferencias en los clones de los anticuerpos monoclonales empleados y las fuentes de los mismos, la raza y edad de los perros cuya sangre se ha analizado, el manejo de las muestras sanguíneas, la metodología empleada en el procesado de las muestras para su posterior análisis en el citómetro de flujo o la metodología empleada en los análisis de los resultados (Byrne et al. 2000).

6.1.1.3. Concentración plasmática de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α

Para mejorar el conocimiento de la respuesta inmunitaria desarrollada en la EMC era esencial llevar a cabo una evaluación de los niveles de expresión de ciertas citocinas. Estas moléculas polipeptídicas son las encargadas de establecer una comunicación entre las células del sistema inmunitario para coordinar sus efectos, lo que hace que en el

estudio de las respuestas inmunitarias, como la que se produce en el curso de la infección por *E. canis*, sea importante valorar no sólo qué poblaciones celulares proliferan y predominan, sino también qué citocinas son secretadas principalmente. Además, y como se describió previamente, se ha sugerido en la bibliografía que algunos de los efectos inmunomoduladores de la doxiciclina podrían venir determinados por su capacidad para actuar sobre la síntesis de algunas citocinas.

Teniendo en cuenta todo esto, en nuestro estudio se ha evaluado la concentración de cuatro de estas citocinas (IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α) en sangre de perros con infección natural por *E. canis*, antes y después del tratamiento con doxiciclina. Sin embargo, al igual que ocurre en el caso del inmunofenotipaje y determinación de las subpoblaciones linfocitarias, los estudios existentes por el momento en medicina veterinaria y, más concretamente, en la especie canina, son muy escasos y no se encuentran publicados unos valores de referencia para la concentración de estos mediadores en sangre periférica de perros sanos. Este hecho nos condujo a la evaluación de la concentración en sangre de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α en la población de perros sanos incluida en nuestro trabajo, para poder así comparar posteriormente los resultados obtenidos en los perros con EMC con los resultados de los perros sanos.

En la evaluación de los resultados obtenidos de la concentración plasmática de estas citocinas es importante recordar una serie de propiedades de estos mediadores que pueden influir en nuestras observaciones: las citocinas son unas moléculas de vida corta y su secreción es un fenómeno breve y autolimitado, lo que puede hacer variar las concentraciones que hallemos en plasma en función del momento. Incluso se ha descrito la influencia de los ciclos circadianos sobre la concentración en sangre de algunas de estas moléculas, como la IL-6 (Kanabrocki et al. 1999), pudiendo variar su concentración en función de la hora del día en la que se obtuvo la muestra sanguínea. Además, es importante tener en cuenta que la mayoría de las citocinas actúan cerca del lugar donde han sido secretadas (acciones autocrinas y paracrinas), por lo que no siempre podremos detectarlas en sangre circulante (Tizard 2009f).

En la bibliografía se describen diversos métodos de estudio de la concentración de estas moléculas en sangre periférica, a partir del sobrenadante de cultivos de células sanguíneas y en diferentes tejidos y fluidos biológicos. Destacan la medición de la concentración mediante ELISA (Engelberts et al. 1991, Helle et al. 1991, Mohamed et al. 1997, Baggio et al. 2005, Quaranta et al. 2006, Kjelgaard-Hansen et al. 2007, de Lima et al. 2007, Keppel et al. 2008, de Lima et al. 2010), la determinación de la expresión de ARNm en las células mediante RT-PCR, QRT-PCR o por hibridación *in situ* (Navikas et al. 1994, Navikas et al. 1995, Netea et al. 1996, Grone et al. 1998, Pinelli et al. 1999,

Chamizo et al. 2005, Breathnach et al. 2006, Carrillo et al. 2008, Manna et al. 2008) y los bioensayos empleando líneas celulares específicas (Yamashita et al. 1994, Pinelli et al. 1994, Bohnhorst et al. 2002). En este caso se emplearon unos kits ELISA comercialmente disponibles para la medición de la concentración de las citocinas mencionadas a partir de las muestras sanguíneas de los perros del estudio.

La concentración plasmática media obtenida para el IFN- γ en 19 perros sanos de diferentes razas, edades y sexos de nuestro estudio fue de 47,85 pg/ml. No se han hallado valores de referencia para la concentración plasmática de este mediador en perros sanos en la bibliografía. Sin embargo, cabe destacar los resultados obtenidos por Gröne y colaboradores en un estudio en el que se evaluaba la expresión de ARNm de diferentes citocinas en sangre periférica de 14 perros con moquillo, 3 perros con otras patologías diferentes al moquillo y 3 perros sanos (Gröne et al. 1998). Estos autores no detectaron ARNm de IFN- γ en las muestras sanguíneas de ninguno de los 20 perros del estudio, lo que contrasta con los hallazgos del presente trabajo, ya que en los 19 perros sanos de diferentes razas, sexos y edades a partir de cuyas muestras sanguíneas se ha podido determinar la concentración plasmática de esta citocina, el menor valor obtenido ha sido de 9,06 pg/ml y el mayor de 103,24 pg/ml, con lo que se podría deducir una expresión de ARNm de este mediador en las células sanguíneas de todos los perros. Estos resultados contradictorios pueden deberse muy probablemente al protocolo laboratorial empleado en la determinación de esta citocina en cada uno de los estudios. La expresión de mRNA no puede igualarse a la producción de la glicoproteína (Navikas et al. 1994, Baggio et al. 2005) y más si tenemos en cuenta la característica de las citocinas de ser secretadas de forma breve y autolimitada tras la estimulación de las células. Por otra parte, no puede descartarse que las diferencias obtenidas en nuestro trabajo y el de Gröne y colaboradores se deban a las características particulares de las poblaciones estudiadas en cada trabajo.

En el caso de la IL-6, la concentración plasmática de los perros sanos de este estudio fue de 47,08 pg/ml, muy superior a lo descrito por Lima y colaboradores en 2007 en 8 perros sanos ($7,4 \pm 3,8$ pg/ml). En este estudio se empleó una técnica ELISA comercial, al igual que en nuestro trabajo. Sin embargo, de Lima y colaboradores emplearon un kit para la detección de IL-6 humana, aprovechando la reactividad cruzada de esta citocina y la canina, por lo que las diferencias obtenidas pueden deberse, al menos en parte, a la diferente sensibilidad de las técnicas ELISA empleadas.

Existen en la bibliografía estudios que reflejan la detección de IL-10 mediante técnicas ELISA y que muestran resultados muy similares para diferentes poblaciones caninas sanas: 14 pg/ml (Quaranta et al. 2006), 18,9 pg/ml (Kjelgaard-Hansen et al. 2007), 19,06 pg/ml (Keppel et al. 2008). Sin embargo, nuestros resultados muestran una media

muy inferior a las descritas en estos estudios (0,55 pg/ml), no habiéndose detectado esta citocina en sangre periférica en 25 de los 29 perros analizados, y variando su concentración en los restantes 4 perros entre 2,87 y 8,38 pg/ml. Todos los estudios mencionados fueron realizados empleando el mismo kit comercial que hemos empleado en nuestro trabajo, por lo que el menor valor observado en nuestra población canina sana podría deberse a diferencias en las características de esta población en comparación con las de los demás estudios. No puede descartarse la posibilidad de la existencia de errores en el procesado de las muestras de nuestro estudio, si bien este punto es altamente improbable teniendo en cuenta que el procesado se ha llevado a cabo de la misma forma para el resto de las citocinas, se han seguido las indicaciones del fabricante, todas las muestras han sido analizadas por duplicado y los controles positivos, así como las curvas patrón incluidas en cada kit, han dado los resultados esperados.

El TNF- α en la sangre de los perros sanos de nuestro estudio se encuentra en una concentración media de 13,20 pg/ml. Este valor es inferior al descrito por Strasser y colaboradores en 2000 en un trabajo en el que comparan, entre otras variables, la concentración de esta citocina en sangre periférica de perros sanos de raza Pastor Alemán en función de su edad. Sus resultados varían entre 51,19 pg/ml en los perros de 4,5 a 7,5 años a 81,86 pg/ml en los perros de 8 a 13 años de edad, existiendo una concentración intermedia (de 58,41 pg/ml) en los perros jóvenes, de 2 a 4 años de edad. La concentración media de TNF- α en los Pastores Alemanes de nuestro estudio (de una edad media de 5,77 años) es de 16,75 pg/ml y no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en este valor en función de su edad ($p=0,178$). Por lo tanto, el menor valor de la concentración media de esta citocina en nuestro trabajo en comparación con el del estudio de Strasser y colaboradores no podría achacarse a diferencias en las razas estudiadas. Sin embargo, estos autores no emplearon un ELISA en esta determinación, sino que utilizaron un bioensayo citolítico con el subclon de sarcoma murino WEHI 13 VAR (ATCC. Nr. CRL-2148;ATCC), por lo que, al menos parcialmente, las diferencias observadas pueden deberse a las técnicas laboratoriales utilizadas en cada trabajo.

En cualquier caso, los resultados obtenidos de las concentraciones plasmáticas de las citocinas estudiadas en nuestra población muestran, en general, una gran variabilidad, con unos valores de desviación típica elevados. Ello puede explicar la ausencia de unos resultados homogéneos entre los escasos estudios publicados en los que se describen las concentraciones de citocinas en sangre periférica de perros sanos o de perros con patologías. Por ello, se hace necesario desarrollar en un futuro estudios con un mayor número de animales y con una técnica estandarizada. Por el momento, es necesario contar con una población control propia cuando se precise evaluar la concentración de estas citocinas en poblaciones caninas con alguna patología.

6.1.2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL SEXO, LA EDAD Y LA RAZA SOBRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS

6.1.2.1. Sexo

No hemos hallado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables analizadas en los perros sanos de nuestro estudio en función del género. En cambio, otros estudios en la especie canina han mostrado la existencia de un mayor porcentaje de linfocitos T en sangre periférica en hembras que en machos (Greeley et al. 1996, Greeley et al. 2001), una mayor actividad de las células NK en los machos (Greeley et al. 2001) y mayores actividades linfoproliferativas en las hembras (Strasser et al. 2000). Asimismo, Faldyna y colaboradores en 2001 describieron la presencia de un mayor porcentaje de linfocitos, linfocitos CD3+ y linfocitos CD4+ y un menor porcentaje de células CD21+ en las hembras que en los machos de las razas Beagle y Teckel, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Algunas de las variables para las que estos autores describen diferencias en función del sexo del animal no han sido evaluadas en este estudio, principalmente aquellas relacionadas con las actividades linfoproliferativas. Para el resto de las variables, el hecho de que en nuestro estudio no se hayan hallado diferencias estadísticamente significativas en función del sexo, existiendo, sin embargo, descripciones en la bibliografía de la existencia de dichas diferencias, puede deberse a las características de las poblaciones estudiadas. Así, los trabajos mencionados han sido llevados a cabo en una sola raza (Pastor Alemán en el caso de Strasser y colaboradores y Labrador Retriever en el caso de Greeley y colaboradores en 1996 y 2001) o en dos razas (Faldyna et al. 2001), mientras que en nuestro trabajo se han incluido perros de diferentes razas, como se describió previamente.

6.1.2.2. Edad

Se ha descrito que el envejecimiento conduce a la aparición de una serie de cambios en el sistema inmunitario tanto en el hombre como en diversas especies animales, destacando la existencia de variaciones en la actividad de las células NK, en la distribución de las subpoblaciones linfocitarias, en la síntesis de anticuerpos y en las respuestas linfoproliferativas inducidas por mitógenos (Greeley et al. 1996, Castle 2000). Así, la inmunosenescencia se define como el estado de desequilibrio de la función inmunitaria que contribuye a la existencia de una susceptibilidad incrementada en la vejez

frente a las infecciones y, posiblemente, frente a las enfermedades autoinmunes o neoplásicas (Castle 2000). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los cambios en los componentes del sistema inmunitario y en sus funciones no se observan solamente en la vejez, sino que van produciéndose de forma progresiva a lo largo de la vida de los animales.

En nuestro estudio, hemos hallado la existencia de una serie de cambios relacionados con la edad en varios de los parámetros inmunológicos analizados. Aunque el número y la distribución de los leucocitos en sangre periférica no reflejan de forma específica las características del sistema inmunológico, su evaluación nos sirve de ayuda en la comprensión de la maquinaria inmunitaria, al ser unos indicadores útiles de su situación. En cuanto al recuento de leucocitos, nuestros resultados reflejan que, al aumentar la edad, se produce un incremento significativo del porcentaje de neutrófilos y un descenso del porcentaje y del número absoluto de linfocitos. En este mismo sentido, otros autores han descrito la existencia de una disminución a lo largo del tiempo de la población linfocitaria en sangre periférica en la especie canina (Faldyna et al. 2001, Greeley et al. 2001, Blount et al. 2005, Reis et al. 2005, Lawler et al. 2008). Estos resultados parecen sugerir una menor influencia de la edad sobre las células del sistema inmunitario innato que sobre las células del adaptativo, aunque esta afirmación se refiere únicamente al recuento celular y no a la funcionalidad. Cabe destacar la descripción en la bibliografía de la ausencia de cambios con la edad en la capacidad fagocítica y bactericida de los neutrófilos (Strasser et al. 2000, Greeley et al. 2001), así como la descripción de la existencia de una activación no específica por parte del sistema inmunitario innato de ciertas sustancias proinflamatorias (Castle 2000) o un incremento de la actividad funcional del sistema del complemento a medida que se produce el envejecimiento (Strasser et al. 2000). Se ha sugerido que estos efectos de la edad sobre la funcionalidad de los componentes del sistema inmunitario innato podrían constituir un mecanismo compensatorio de un descenso de la funcionalidad de las respuestas adaptativas (Castle 2000), aunque para la confirmación de este punto se requeriría la realización de una serie de estudios centrados en el efecto de la edad sobre los componentes del sistema inmunitario innato. A diferencia del incremento de la actividad de las respuestas innatas, se ha descrito la existencia de un descenso en la actividad linfoproliferativa con la edad, siendo éste uno de los cambios más constantes descritos en los estudios de envejecimiento (Greeley et al. 1996, Strasser et al. 2000, Greeley et al. 2001, HogenEsch et al. 2004, Lawler et al. 2008). En cuanto al mayor porcentaje de neutrófilos observado en los perros adultos en comparación con los cachorros en la población canina sana de nuestro estudio, probablemente se deba al descenso observado en el recuento linfocitario, y no a un aumento real del número de neutrófilos, lo que se confirmaría por la ausencia de

diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto de neutrófilos entre los diferentes grupos de edad ($p=0,960$).

Por otra parte, en este estudio se ha observado que algunos de los parámetros del estudio electroforético de las proteínas plasmáticas sufren cambios a lo largo de la vida del perro. Concretamente, se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre los grupos de edad analizados en el porcentaje y en el valor absoluto de las γ -globulinas ($p=0,000$ y $p=0,001$, respectivamente), presentando los cachorros menores valores tanto absolutos como relativos de esta fracción proteica (0,3009 g/dl y 5,191%) que los jóvenes (0,4944 g/dl y 8,078%) y los adultos (0,5277 g/dl y 8,020%). De la misma forma, otros trabajos han mostrado un incremento con la edad de la concentración de γ -globulinas (Strasser et al. 2000). Asimismo, se ha descrito que la concentración de IgA va aumentando con la edad del perro (HogenEsch et al. 2004, Blount et al. 2005), no habiéndose observado este efecto sobre otras inmunoglobulinas, como la IgM y la IgG (HogenEsch et al. 2004).

Dentro de la población linfocitaria, hemos observado en nuestro trabajo una serie de cambios con la edad en las diferentes subpoblaciones analizadas. En concreto, se ha hallado una tendencia hacia el descenso con el paso del tiempo en el número absoluto de linfocitos T (CD3+), células Th (CD3+CD4+), células B (CD21+) y linfocitos que expresan CMHII en su superficie. Además, se ha observado un descenso con la edad del porcentaje de los linfocitos Th CD3+CD4+ unido a un incremento del porcentaje de los linfocitos Tc CD3+CD8+, lo que conduce a un descenso con la edad del cociente CD4/CD8. Diversos autores han analizado, al igual que nosotros, el efecto que tiene la edad sobre el inmunofenotipo en el perro, habiendo hallado, por lo general, resultados similares a los nuestros, con pequeñas diferencias que pueden venir dadas tanto por las características de las poblaciones estudiadas como por el protocolo y la técnica empleados en cada trabajo.

Al igual que en esta tesis doctoral, el número de linfocitos T parece disminuir con la edad en las poblaciones de perros sanos estudiadas por diversos autores (Greeley et al. 2001, Blount et al. 2005, Reis et al. 2005, Lawler et al. 2008, Hogenesch & Thompson 2009). Se ha sugerido que en el descenso del número de linfocitos y de células T podría estar implicada de forma clave la involución tímica (Strasser et al. 2000). Además, se ha demostrado que con la edad se producen una disminución del número de linfocitos T vírgenes (Hogenesch & Thompson 2009) así como una serie de cambios en la capacidad mitótica de las células (Strasser et al. 2000). Estos cambios podrían ser responsables, al menos en parte, de este descenso del número de linfocitos y células T observados en la mayoría de los estudios. Algunos autores han sugerido, además, que con el envejecimiento

se producen cambios en la secreción de citocinas que podrían conducir a una disminución en la capacidad de comunicación y cooperación entre las diferentes subpoblaciones linfocitarias, lo que llevaría a un descenso en la activación y proliferación linfocitaria (Strasser et al. 2000).

A pesar del descenso del número de linfocitos T con la edad del perro, el efecto del envejecimiento sobre el porcentaje de estas células en sangre periférica está menos claro, habiéndose descrito tanto la ausencia de cambios (Faldyna et al. 2001, HogenEsch et al. 2004) como la existencia de un incremento de este porcentaje con la edad del animal (Greeley et al. 1996, Greeley et al. 2001, Reis et al. 2005). Así, a pesar de que no se han alcanzado diferencias que sean estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre los diferentes grupos de edad en nuestro trabajo ($p=0,065$), cabe destacar que el valor de p obtenido está cercano a la significación estadística, y se ha observado que los cachorros sanos muestran un menor porcentaje de linfocitos T (61,89%) que los jóvenes (65,48%) y que los adultos (67,21%). Del mismo modo, Greeley y colaboradores en 2001 describieron un descenso con la edad del recuento de linfocitos T en sangre periférica, mientras que el porcentaje de dichas células tendía a aumentar con la edad del animal. Debe tenerse en cuenta que, como se ha comentado previamente, los valores porcentuales deben ser analizados siempre teniendo en cuenta que se encuentran influenciados por los recuentos de las demás poblaciones celulares.

Por otra parte, nuestros resultados han mostrado que la población de linfocitos Th tiende a descender a lo largo del tiempo, tanto en su valor relativo como en su valor absoluto. Diversos autores han descrito también una disminución con la edad de los linfocitos Th en el perro (Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, Greeley et al. 2001, HogenEsch et al. 2004, Blount et al. 2005, Reis et al. 2005, Lawler et al. 2008). Horiuchi y colaboradores describieron en 2007 un incremento con la edad de la relación Th1/Th2 en el perro (Horiuchi et al. 2007b). En nuestro trabajo no se ha analizado la síntesis de citocinas por los linfocitos de forma específica, por lo que no se ha podido determinar qué proporción de linfocitos Th eran fenotípicamente Th1 y cuántos eran Th2.

En el gato se ha descrito que la timopoyesis postnatal parece preferir la maduración de linfocitos T CD8+ frente a la maduración de los linfocitos T CD4+, lo que conduce a que con la edad vaya aumentando la proporción de linfocitos Tc en sangre periférica (Bortnick et al. 1999). Esto podría explicar el mayor porcentaje de linfocitos Tc en sangre de los perros sanos de nuestro estudio incluidos en el grupo de los adultos (23,73%) en comparación con los jóvenes (18,08%) y con los cachorros (12,59%). Este incremento ha sido descrito también por otros autores (Greeley et al. 1996, Faldyna et al. 2001, Greeley et al. 2001, HogenEsch et al. 2004, Blount et al. 2005).

De forma estrechamente relacionada, el incremento de la proporción de linfocitos Tc y el descenso de los linfocitos Th conducen a un descenso con la edad aún mayor en el cociente CD4:CD8 en la población canina estudiada, lo que ha sido descrito con anterioridad en la bibliografía (Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, HogenEsch et al. 2004, Blount et al. 2005). Cabe destacar que diversos estudios de envejecimiento han mostrado que los descensos en el ratio CD4:CD8 se asocian con un incremento en la mortalidad en las personas ancianas (Wikby et al. 1998).

El efecto de la edad sobre el sistema inmunitario canino no se limita a las subpoblaciones de linfocitos T, sino que también se han descrito alteraciones de la población de células B. Se ha descrito un descenso del porcentaje (Greeley et al. 1996, Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001, Greeley et al. 2001, Reis et al. 2005) y del número absoluto (Blount et al. 2005, Reis et al. 2005) de linfocitos B en sangre en el perro a medida que va aumentando la edad de los animales. En el presente trabajo se han hallado diferencias estadísticamente significativas ($p=0,039$) en el valor absoluto de linfocitos B (CD21+) entre los perros sanos adultos (441,61 linfocitos B/ μ l) y los cachorros (749,56 linfocitos B/ μ l), lo que, sin embargo, no se refleja en el valor relativo en función de la edad del animal ($p=0,216$). A pesar del descenso en la población de linfocitos B con la edad, las respuestas humorales que se desencadenan en los perros ancianos parecen ser adecuadas, como sugieren los resultados de HogenEsch y colaboradores (2004) y Schultz y colaboradores (2009) que muestran que, tras la inmunización con vacunas comercialmente disponibles y de uso común, se alcanzan niveles de anticuerpos similares en los perros de edad avanzada y en los perros jóvenes.

En la especie canina la expresión de CMH de clase II en la superficie linfocitaria ha sido menos estudiada que la expresión de otras moléculas de superficie. En este trabajo se ha observado, de forma similar a lo descrito por Reis y colaboradores en 2005, un descenso del número de linfocitos que expresan CMHII en su superficie con la edad. Se ha sugerido que este efecto de la edad podría deberse al desarrollo de mecanismos de tolerancia inmunitaria adquirida como una consecuencia de la continua exposición antigénica ambiental a la que es sometido el perro a lo largo de su vida (Reis et al. 2005). Esto parece reflejarse en un incremento de la tolerancia a lo extraño y una disminución de la auto-tolerancia en la vejez, con el consiguiente desarrollo de enfermedades autoinmunes (Strasser et al. 2000).

La concentración plasmática de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de edad de nuestro trabajo. De la misma forma, Strasser y colaboradores (2000) no hallaron cambios con la edad en la actividad sérica de TNF- α en una población de perros de raza Pastor

Alemán. Sin embargo, estos autores observaron que la concentración sérica de IL-2 tendía a disminuir con la edad y, únicamente en las hembras del estudio, la actividad de IL-1 tendía a aumentar con la edad. Se ha sugerido que el descenso en la concentración de IL-2 en sangre puede deberse al descenso de la movilización del calcio y de las actividades de los mensajeros secundarios de la proteína quinasa C (Greeley et al. 1996) y que esta disminución de la producción de IL-2, unida a un descenso en la síntesis de ADN y a cambios en la fluidez de la membrana plasmática, puede participar en los complejos mecanismos que conducen al descenso en las respuestas linfoproliferativas a mitógenos (Strasser et al. 2000).

Todos estos cambios asociados con la edad en el sistema inmunitario canino pueden ser responsables de la aparición de múltiples enfermedades en la vejez y pueden afectar a las expectativas de vida del mismo animal, por lo que deberían ser tenidas en cuenta por el veterinario clínico (Strasser et al. 2000).

6.1.2.3. Raza

Se ha descrito en la bibliografía la existencia de ciertas diferencias en el sistema inmunitario de los perros en función de su raza, si bien los estudios al respecto son muy escasos (Byrne et al. 2000, Faldyna et al. 2001). Estas diferencias podrían ser las responsables de la predisposición de algunas razas a padecer determinadas enfermedades, autoinmunes o no. Así, en la revisión bibliográfica de esta memoria se ha descrito la posible influencia de la raza en el curso de la EMC, habiéndose sugerido que los Pastores Alemanes son más susceptibles a padecer una ehrlichiosis más grave y de peor pronóstico que los Beagles, probablemente por el desarrollo de una respuesta inmunitaria celular disminuida en los primeros en comparación con los segundos (Nyindo et al. 1980).

En nuestro trabajo se han clasificado los 47 perros sanos en 4 grupos de razas: Pastor Alemán, Galgo Español, Beagle y Otras razas. Se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre las razas estudiadas para algunos de los parámetros del sistema inmunitario que han sido evaluados en nuestro trabajo. Curiosamente, en muchos de los casos el test de Bonferroni ha determinado que la diferencia se halla precisamente entre las razas Pastor Alemán y Beagle.

Entre las poblaciones leucocitarias en sangre periférica, los valores relativo y absoluto de los neutrófilos ($p=0,001$ y $p=0,021$, respectivamente) y de los eosinófilos ($p=0,000$ y $p=0,000$, respectivamente) y el valor porcentual de los linfocitos ($p=0,003$) parecen estar afectados por la raza. Los Beagles sanos del estudio han mostrado poseer

menores porcentajes y valores absolutos de neutrófilos en sangre periférica (52,70% y 4626,155/ μ l, respectivamente) que los Pastores Alemanes (64,182% y 7005,91/ μ l) y el porcentaje de estas células en los Beagles es también inferior al observado en los Galgos (62,86%). Probablemente debido a este menor número de neutrófilos en sangre periférica en los Beagles se ha hallado un mayor porcentaje de linfocitos en sangre en esta raza (34,04%) que en los Pastores Alemanes (24,34%). En los Beagles y Pastores Alemanes el porcentaje y el valor absoluto de los eosinófilos en sangre periférica son superiores a los de los Galgos, siendo, además, el porcentaje de estas células superior en los Beagles que en los perros de Otras razas. Algunas de las diferencias descritas podrían venir dadas por las características de las poblaciones caninas estudiadas, ya que los 13 Beagles sanos del estudio pertenecen al animalario del Hospital Clínico Veterinario Complutense, con unas condiciones ambientales controladas, sin acceso a la calle en ningún momento y con una alimentación a base de pienso comercial, mientras que los 11 Pastores Alemanes sanos del estudio pertenecen a la Policía Nacional, son perros de trabajo y salen a la calle de forma regular. Asimismo, los Galgos incluidos en el grupo de perros sanos del estudio pertenecen a un propietario particular que los emplea en la caza y los 10 perros de Otras razas son animales de compañía pertenecientes a propietarios particulares. Por lo tanto, debido a la influencia de diversos factores, como la alimentación (Lawler et al. 2008, Cotman & Head 2008), sobre el sistema inmunitario, no podemos descartar que las diferencias halladas en nuestro estudio entre las razas analizadas no se deban realmente a la influencia de otras variables.

Entre dichas variables que pueden afectar a nuestros resultados de la influencia de la raza sobre el sistema inmunitario canino cabe destacar la edad de los animales, factor cuya influencia en la inmunidad ha sido demostrada en la bibliografía tanto en la especie canina como en otras especies animales y en el hombre y como se comprueba en nuestros propios resultados. Debido a que la distribución en cuanto a la edad en los distintos grupos de razas no es homogénea (Tabla 92), no hemos podido descartar que las diferencias halladas para algunas variables entre los grupos de razas no se deban realmente a la edad.

Tabla 92: Edad media de los grupos de razas incluidos en la población de perros sanos de este estudio

	Edad media (años)
Beagle	1,24
Pastor Alemán	5,77
Galgo Español	3,8
Otras razas	3,12

En concreto, los mayores valores porcentual y absoluto de los neutrófilos y el menor porcentaje de linfocitos hallados en la población canina sana de Beagles de nuestro estudio en comparación con los Pastores Alemanes puede deberse a que estas variables tienden a aumentar en el caso de los neutrófilos y a disminuir en el caso de los linfocitos con la edad del perro, y los perros de la raza Pastor Alemán (5,77 años de media) son mayores que los perros de la raza Beagle (1,24 años de media) del estudio (Tabla 92). En el caso de los valores porcentual y absoluto de eosinófilos en sangre periférica de los perros sanos, no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas en relación con la edad de los animales, por lo que las diferencias halladas entre los grupos raciales pueden venir dadas por la raza, aunque, como se ha comentado previamente, no puede descartarse la influencia de otros factores que no han sido analizados en este estudio.

Por otra parte, en este trabajo se ha observado que algunos de los parámetros del estudio electroforético de las proteínas plasmáticas muestran diferencias en función de la raza del animal. En concreto se ha observado que los Pastores Alemanes presentan mayores valores relativos y absolutos de γ -globulinas (9,26% y 0,69 g/dl, respectivamente) que los Beagles (6,21% y 0,37 g/dl, respectivamente), lo que podría venir dado, una vez más, por la edad media de estos grupos raciales, ya que, como se describió previamente, parece existir un incremento de esta fracción proteica con el envejecimiento y los Pastores Alemanes son mayores que los Beagles del estudio (Tabla 92). Sin embargo, también son superiores estos valores en los Pastores Alemanes que en los Galgos del estudio (6,45% y 0,37 g/dl), a pesar de que la edad media de ambos grupos raciales haría clasificarlos a ambos en el grupo de perros adultos de nuestro trabajo. Por lo tanto, en este caso podría existir una influencia racial para la concentración plasmática de γ -globulinas, sin que podamos descartar la influencia de otros factores, como la alimentación y el hábitat, en estos resultados. En este mismo sentido, el hallazgo en este estudio de que los Galgos presentan un mayor cociente Albúmina/Globulinas (1,33) que los Beagles (1,13) y que los Pastores Alemanes (1,00), no parece deberse a diferencias en la edad de los animales, por lo que sería necesario llevar a cabo nuevos estudios con un mayor número de animales de diferentes razas para poder comprobar si estos resultados se deben a diferencias raciales o a la influencia de otros factores.

Entre las subpoblaciones linfocitarias analizadas, se ha observado que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de razas en el valor porcentual de los linfocitos T (CD3+) y B (CD21+) así como sobre los valores porcentual y absoluto de linfocitos Tc (CD3+CD8+) y sobre el cociente CD4:CD8. Faldyna y colaboradores describieron en 2001 resultados que son, por lo general, similares a los nuestros al estudiar las diferencias existentes en el inmunofenotipo de 56 perros pertenecientes a 4 razas (Beagle, Pastor Alemán, Dálmata y Dachshund). En nuestro trabajo hemos observado que

los Pastores Alemanes muestran un mayor porcentaje de linfocitos T (CD3+) (69,86%) que los Beagles (62,38%), lo que concuerda con los hallazgos de Faldyna y colaboradores (2001). Sin embargo, Byrne y colaboradores publicaron en 2000 un estudio en el que también analizaron las diferencias entre varias razas de perros para ciertas variables del sistema inmunitario canino y no encontraron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T entre ellas. En nuestro trabajo no se puede descartar que las diferencias encontradas en la población de linfocitos T (CD3+) entre las razas estudiadas se puedan deber a una influencia de la edad, ya que, aunque se había hallado una tendencia hacia el descenso en el valor absoluto de esta población de linfocitos T con la edad, nuestros resultados muestran que, aunque de forma no significativa estadísticamente, el valor porcentual parece ir aumentando con el tiempo, pasando de 61,89% en los cachorros a 65,48% en los perros jóvenes y a 67,21% en los adultos y, precisamente, los Pastores Alemanes (el grupo de mayor edad de nuestro estudio) muestran un mayor porcentaje de estas células que los Beagles (el grupo de menor edad). Además, no podemos descartar que otras características de los grupos estudiados, como son el hábitat, la actividad física o la alimentación, puedan haber influido en nuestros resultados.

En cuanto a la subpoblación de linfocitos Tc, los Pastores Alemanes muestran mayores valores porcentual y absoluto (25,54% y 648,55/ μ l, respectivamente) que los Beagles (13,21% y 384,01/ μ l, respectivamente) y mayor porcentaje únicamente que los perros de Otras razas (18,45%). Los Galgos poseen también un mayor porcentaje de linfocitos Tc (23,10%) que los Beagles. Algunos estudios previos muestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los Beagles y los perros de otras razas en la población de linfocitos Tc (Byrne et al. 2000). Faldyna y colaboradores (2001) hallaron un mayor porcentaje de linfocitos Tc (CD8+) en los Dálmatas (24,5%) que en los Dachthunds (20,7%), los Beagles (18,3%) y los Pastores Alemanes (17%). Estos hallazgos son diferentes a los observados en nuestro estudio, tanto por los valores porcentuales obtenidos en los Beagles y Pastores Alemanes en comparación con nuestros resultados para las mismas razas, como por ser inferior este porcentaje en los Pastores Alemanes que en las demás razas estudiadas. Las diferencias entre nuestro estudio y los trabajos de otros investigadores pueden deberse a las técnicas laboratoriales empleadas en cada caso o a las características de las poblaciones caninas. En cuanto a las diferencias observadas en nuestro estudio en la subpoblación linfocitaria Tc entre las razas estudiadas, éstas pueden deberse a las propias características de los cuatro grupos raciales comparados o a diferencias reales en función de la raza del perro. Sin embargo, tampoco puede descartarse en este caso que estas diferencias se deban realmente al efecto de la edad sobre esta población celular, ya que en el presente estudio se ha hallado un aumento del porcentaje de linfocitos Tc con la edad de los perros, lo que podría justificar el que se haya encontrado un mayor porcentaje y valor absoluto de estas células en el grupo de raza

cuya edad media es superior a los demás grupos (el Pastor Alemán) y unos menores valores en los perros de raza Beagle, que son además los más jóvenes del estudio (Tabla 92).

El hecho de que en los Beagles de nuestro estudio se hayan encontrado los menores valores porcentuales y absolutos de la población de linfocitos Tc (CD8+) en comparación con las demás razas estudiadas ha conducido a que el cociente CD4:CD8 sea superior en esta raza (3,00) que en los Galgos (1,69) y en los Pastores Alemanes (1,40). En estos últimos, este cociente es inferior, a su vez, al encontrado en los perros de Otras razas (2,35). Coincidiendo con nuestros resultados, Byrne y colaboradores obtuvieron también un mayor cociente CD4:CD8 en los Beagles que en otras razas de perro. Sin embargo, Faldyna y colaboradores, aunque obtuvieron un mayor cociente CD4:CD8 en los Beagles en comparación con los Dálmatas y los Dachthunds, describieron un mayor valor de esta variable en los Pastores Alemanes en comparación con las demás razas. Debido a que este parámetro depende de modo directo de las poblaciones CD4+ y CD8+, los factores que han podido influir en nuestros resultados son los mismos que los descritos previamente para la población linfocitaria Tc.

El porcentaje de linfocitos B CD21+ de los perros sanos incluidos en este estudio ha resultado ser superior en el grupo de raza Beagle (22,89%) que en los Pastores Alemanes (14,30%). Faldyna y colaboradores obtuvieron del mismo modo un mayor porcentaje de estas células en los Beagles que en los Pastores Alemanes de su trabajo, si bien la mayor diferencia en su estudio se encuentra entre los Dálmatas (21,2% de linfocitos B) y las demás razas. El hecho de que los Beagles de nuestro estudio hayan mostrado un porcentaje superior de células B en sangre periférica al de los Pastores Alemanes podría deberse a diferencias raciales o a diferencias en las características de los grupos, no pudiendo descartarse la influencia de la edad para esta variable, ya que se había descrito un descenso de esta población con la edad y es precisamente en los perros de mayor edad de nuestro trabajo (los Pastores Alemanes) donde se ha encontrado el menor porcentaje de estas células.

A la vista de estos resultados, sería recomendable llevar a cabo nuevos estudios tratando de establecer subgrupos de edades más homogéneos y procurando que las condiciones ambientales de las diferentes poblaciones caninas sean semejantes.

En cuanto a la concentración plasmática de las citocinas IFN- γ , IL-10 y TNF- α , no se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de razas del estudio. Sin embargo, en el caso de la concentración plasmática de IL-6, se han hallado diferencias estadísticamente significativas ($p=0,009$), destacando la existencia de

una menor concentración de este mediador en los perros de raza Pastor Alemán (10,24 pg/ml) que en los Beagles (58,54 pg/ml) y que en los perros de Otras razas (71,57 pg/ml). En este caso, no parece que la influencia de la edad sobre el sistema inmunitario canino sea responsable de esta diferencia en función de la raza. Sin embargo, no puede descartarse que otras variables diferentes a la raza, como el hábitat, la alimentación o la aptitud, puedan haber influido sobre este parámetro, por lo que sería necesario llevar a cabo estudios con un mayor número de animales.

6.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS ENTRE LAS POBLACIONES DE PERROS SANOS, CON EMC Y CON OTRAS PATOLOGÍAS

La anemia es una de las alteraciones hematológicas más frecuentes en el curso de la EMC (Reardon & Pierce 1981a, Woody & Hoskins 1991, Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999). Por esta razón, no resulta sorprendente que en este estudio se hayan hallado diferencias estadísticamente significativas en el valor del hematocrito, de la concentración de hemoglobina y H.C.M. entre los perros con EMC y los perros sanos, siendo superiores estos valores en los perros sanos. Por otra parte, los perros con patologías oncológicas muestran unos valores de hemoglobina y de hematocrito sólo ligeramente superiores a los observados en los perros con EMC, inferiores también estadísticamente a los de los perros sanos, lo que confirma lo descrito por diversos autores en la bibliografía que han hallado frecuentemente en la analítica sanguínea de perros con neoplasias de distintos orígenes la existencia de anemia (Vernau & Moore 1999, McDonough & Moore 2000, Weiss 2001, Tasca et al. 2009, Ameri et al. 2010). También se ha descrito en la bibliografía la posible existencia de anemia en perros afectados por enfermedad inflamatoria intestinal (Ristic & Stidworthy 2002) y en este trabajo se ha hallado, precisamente, un menor hematocrito en los perros con patologías gastrointestinales en comparación con los perros sanos.

La trombocitopenia es un hallazgo laboratorial que se asocia tradicionalmente a la EMC (Huxsoll et al. 1970, Woody & Hoskins 1991, Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Mylonakis et al. 2004, Neer & Harrus 2006). De acuerdo con esta afirmación, nuestro trabajo ha mostrado que los perros con EMC presentan los menores valores de plaquetas por microlitro de sangre periférica de todos los grupos de perros estudiados. A pesar de ello, debe recordarse que nunca debe descartarse una EMC por la

existencia de recuentos plaquetarios dentro del rango de la normalidad, ya que, como se ha reflejado en la tabla 32A del apartado de resultados de esta tesis doctoral, dentro del grupo de perros con EMC los valores de este parámetro han variado desde 5000 hasta un máximo de 433000 plaquetas/ μ l de sangre, muy por encima del límite superior establecido para la especie canina, y, en cambio, algunos de los perros con otras patologías han presentado trombocitopenia. En este sentido, cabe destacar que se ha sugerido que, debido a que el hallazgo de bajos recuentos plaquetarios en la analítica sanguínea es a menudo uno de los indicadores que hacen sospechar de EMC a los veterinarios clínicos y, por tanto, conduce a realizar pruebas específicas frente a la enfermedad, la frecuencia de presentación de trombocitopenia que ha sido reportada en la bibliografía puede estar sobrevalorada (Neer & Harrus 2006).

En la EMC los hallazgos del leucograma pueden ser muy variables (Mylonakis et al. 2004), pudiendo encontrarse desde leucocitosis hasta leucopenia y diversas alteraciones de las subpoblaciones leucocitarias. En nuestro trabajo, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en el recuento leucocitario total entre los perros sanos y los perros con EMC, así como con las demás poblaciones caninas estudiadas. Asimismo, los perros con infección por *E. canis* no presentan diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos en comparación con los perros sanos y los valores medios de estas variables se encuentran dentro de los rangos fisiológicos para la especie canina. En cambio, el valor porcentual de los neutrófilos es significativamente superior en los perros con patologías traumatológicas, digestivas y oncológicas que en los perros sanos y en los perros con EMC. Este incremento puede deberse a la puesta en funcionamiento de una respuesta inmunitaria innata temprana o a respuestas inflamatorias que se reflejan en la hematología en algunos de los casos, si bien es importante recalcar que la media de este porcentaje se encuentra en todos los grupos dentro del rango fisiológico para la especie canina. En diversas patologías oncológicas se ha descrito la existencia de neutropenia (Vernau & Moore 1999, Tasca et al. 2009), pero también es frecuente la aparición de neutrofilia en patologías como la leucemia aguda con linfocitosis granular grande, por ejemplo (Vernau & Moore 1999, McDonough & Moore 2000), por lo que el mayor porcentaje de estas células encontrado en los perros con patologías oncológicas no es un hallazgo sorprendente. También en los perros con patologías oncológicas se han encontrado unos menores valores absoluto y relativo de linfocitos que en los perros sanos y que en los perros con EMC, permaneciendo dichos valores dentro de los rangos de referencia para el perro. La diversidad de orígenes de las neoplasias de los perros de este grupo probablemente se encuentre detrás de este resultado. Además, se ha observado que el porcentaje de monocitos es menor en los perros con patologías digestivas que en los perros sanos. En todos los casos, estos parámetros

medios se encuentran dentro de los rangos de referencia y no parece que estas diferencias encontradas tengan una significación clínica importante.

En cuanto a la bioquímica sanguínea básica, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas para los valores medios de glucosa, urea, creatinina y GPT entre los perros con EMC y los perros sanos, encontrándose además los valores medios de estos parámetros dentro de los rangos fisiológicos para la especie canina. Sin embargo, destaca la existencia de un mayor valor medio de urea en todos los perros del Grupo 3 (tanto con patologías mucocutáneas como digestivas, traumatológicas y oncológicas) que en los perros sanos. Además, estos valores medios son algo mayores que el límite superior establecido para la especie canina. En este sentido, cabe destacar que, aunque no se ha mostrado en el apartado de resultados de esta tesis doctoral, se han hallado diferencias estadísticamente significativas ($p=0,011$) en el valor de urea en función de la edad del animal, aumentando en los perros adultos en comparación con los jóvenes. Por lo tanto, al menos en parte, la diferencia encontrada en este valor puede deberse a que la edad media de los perros del Grupo 3 es de 6,83 años, en comparación con la edad media de 3,41 años en los perros sanos.

Como se describió previamente, el hallazgo más frecuente de la bioquímica sanguínea en los perros con EMC es la hiperproteinemia por hiperglobulinemia, que se asocia a menudo con hipoalbuminemia (Greene 1986, Woody & Hoskins 1991, Hibler et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Neer et al. 2002, Mylonakis et al. 2004, Harrus & Waner 2010). De acuerdo con esta afirmación, en este trabajo se han hallado diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de proteínas totales y en el porcentaje de albúmina entre los perros con EMC y los perros sanos. El valor medio de las proteínas plasmáticas totales en los perros con EMC se encuentra por encima del límite superior establecido para la especie canina y es superior, a su vez, al valor medio de los perros sanos de este estudio. El valor porcentual de albúmina plasmática en los perros con EMC se encuentra por debajo del límite inferior fisiológico en el perro y es menor que en los perros sanos y que en los perros con patologías mucocutáneas. La concentración plasmática de esta fracción proteica es inferior al de los demás grupos estudiados en los perros con EMC y en los perros con patologías gastrointestinales, en los cuales se describe igualmente con frecuencia la presencia de hipoproteinemia (Rodríguez-Franco et al. 1999).

De forma relacionada con la hiperproteinemia y con el menor porcentaje y valor absoluto de albúmina plasmática, en los perros con EMC se ha encontrado una mayor concentración plasmática de globulinas que en los perros sanos y que en los demás perros del estudio. En todas las fracciones de globulinas se han encontrado diferencias

estadísticamente significativas entre los perros con EMC y los perros sanos, mostrando los perros con infección por *E. canis* menores valores de α 1- y α 2-globulinas y cociente A/G y mayores valores de β - y γ -globulinas. La hiperglobulinemia en estos animales se debe, por tanto, a una hipergammaglobulinemia, con participación asimismo de un aumento de las β -globulinas. En este sentido, cabe destacar que se ha descrito a menudo en la bibliografía que la hiperproteinemia en los perros con infección por *E. canis* se debe a una gammapatía policlonal o, de forma menos frecuente, a una gammapatía monoclonal (Breitschwerdt et al. 1987, Neer et al. 2002). En este aumento de globulinas puede participar la síntesis de anticuerpos específicos frente al agente causal de la EMC, pero también la síntesis de anticuerpos no específicos (Reardon & Pierce 1981a, Harrus et al. 1996a, Harrus et al. 1999, Frank & Breitschwerdt 1999, Waner et al. 2000a).

La respuesta inmunitaria desarrollada en el curso de la EMC es de una gran importancia, tanto desde el punto de vista de la resolución de la infección como desde el punto de vista de la inmunopatogenia de la enfermedad. El estudio inmunofenotípico en sangre periférica realizado en los perros con EMC del presente trabajo ha mostrado que estos animales muestran un mayor porcentaje de linfocitos T (CD3+) que los perros sanos, siendo superior también el valor absoluto de estas células en los perros con EMC, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa en este caso. Las respuestas inmunitarias desarrolladas frente a las infecciones por agentes intracelulares son, por lo general, mediadas por células T (Akkoyunlu & Fikrig 2000, Tizard 2009h), por lo que este resultado parece indicar que en los perros con EMC de este estudio se ha desarrollado una respuesta característica de este tipo de infecciones. Como se describió en la revisión bibliográfica de esta tesis doctoral, los conocimientos actuales sobre la inmunidad en la infección por *Ehrlichia* spp. señalan la importancia protectora de las células Th (CD4+) productoras de citocinas de tipo 1 y que conducen a una respuesta inmunitaria de base celular, aunque sugieren que los linfocitos Tc (CD8+) y las células B participan también en la defensa del organismo frente a estos agentes. En relación con los linfocitos Th (CD4+), no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ni en el valor absoluto ni en el relativo entre los perros con EMC y los perros sanos del estudio, mientras que los linfocitos Tc (CD8+) se encuentran aumentados en los perros con infección por *E. canis* en comparación con los sanos. Se ha descrito previamente en la bibliografía que en los perros con infección por este agente se desarrolla una alteración en las subpoblaciones de linfocitos sanguíneos que conducen a una inversión del índice CD4:CD8 (Frank & Breitschwerdt 1999, Heeb et al. 2003, Lorente et al. 2008) y, aunque en este trabajo no se han alcanzado diferencias que sean estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, se observa un menor cociente CD4:CD8 en los perros con EMC en comparación con los perros sanos, lo que, unido al aumento de la subpoblación TCD8+ en nuestro estudio, concuerda con lo descrito por estos autores. Hess y colaboradores en 2005

describieron la ausencia de inmunosupresión en perros con infección experimental por *E. canis*, aunque describieron la existencia de una linfocitosis TCD8+. En este punto cabe destacar que en la infección natural en el perro por el protozoo intracelular *L. chagasi* se ha descrito que una de las claves para el desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva es la existencia de unos niveles elevados de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+, y que la principal característica inmunofenotípica de una enfermedad asintomática y baja carga parasitaria es precisamente el incremento del número de linfocitos T CD8+ en sangre periférica (Reis et al. 2006). No se han encontrado otras alteraciones en las demás subpoblaciones linfocitarias de los perros con EMC de este estudio en comparación con los perros sanos. Sin embargo, se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre algunas de las variables del inmunofenotipo en los perros con patologías oncológicas en comparación con la población canina sana. Entre estas diferencias destaca la existencia de menores valores absolutos de linfocitos T, Th y B, por lo que el menor valor absoluto de linfocitos hallado en estos perros se debe a un descenso de estas subpoblaciones.

A pesar de la descripción de un papel esencial de diversas citocinas en la resolución de la infección por *Ehrlichia* spp. (Feng et al. 1994, Akkoyunlu & Fikrig 2000, Waner et al. 2001, Bitsaktsis et al. 2004, Feng & Walker 2004) no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α entre los perros con EMC y los perros sanos incluidos en el estudio. Al menos en parte la ausencia de diferencias puede deberse a la actuación a nivel local de estos mediadores y a su actuación y liberación en espacios breves de tiempo, lo que puede dificultar en ocasiones su medición en sangre periférica. Además, es importante recalcar que la mayoría de los estudios consultados referentes a la actuación de las citocinas en las infecciones causadas por *Ehrlichia* spp. se han llevado a cabo en modelos experimentales murinos (Akkoyunlu & Fikrig 2000, Feng & Walker 2004, Bitsaktsis et al. 2004), por lo que no puede descartarse que la ausencia de diferencias en la concentración plasmática de las citocinas evaluadas en nuestro estudio entre los perros con EMC y los perros sanos se deban a las características propias de la infección natural. Sin embargo, en la infección natural activa por *L. chagasi* en el perro se han observado mayores niveles de IL-6 sérica que en los perros sanos, sugiriéndose que la determinación de esta citocina podría ser empleada como un marcador de enfermedad activa durante la leishmaniosis (de Lima et al. 2007). Sería necesario llevar a cabo nuevos estudios con un mayor número de animales para determinar el papel de las diferentes citocinas en la infección natural por *E. canis* en el perro.

6.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS ENTRE LOS PERROS CON EMC EN FASE SUBCLÍNICA Y LOS PERROS CON EMC EN FASE CLÍNICA

Debido a las dificultades ya descritas para distinguir las fases aguda y crónica de la enfermedad en la infección natural (Woody & Hoskins 1991), se clasificaron los animales con EMC como sintomáticos o asintomáticos. Atendiendo a esta clasificación, los resultados de este trabajo muestran que los perros con EMC presentan diferencias estadísticamente significativas en algunas de las variables analizadas en función de la fase de la enfermedad en la que se encuentren.

La trombocitopenia existente en muchos perros con EMC puede aparecer a partir de los 15 días tras la infección y puede mantenerse durante todas las fases de la enfermedad (Huxsoll et al. 1970, Woody & Hoskins 1991, Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Mylonakis et al. 2004, Neer & Harrus 2006). De acuerdo con esta afirmación, no hemos hallado en nuestro trabajo diferencias estadísticamente significativas entre los perros con EMC en fase clínica y en fase subclínica ($p=0,595$), manteniéndose en ambos grupos una media inferior a 200.000 plaquetas por microlitro de sangre periférica y siendo sólo ligeramente inferior este valor en los perros con EMC sintomática ($160,63 \times 10^3$ plaquetas/ μl en los perros en fase clínica y $182,38 \times 10^3$ plaquetas/ μl en los perros en la fase subclínica).

En cambio, se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre los perros sintomáticos y los perros asintomáticos para otras variables de la hematología. En concreto, los perros en una fase clínica han mostrado menores recuentos eritrocitarios, concentración de hemoglobina y hematocrito que los perros en fase subclínica. Cabe destacar, además, que en la fase clínica, los perros han presentado para estas variables valores medios por debajo del límite inferior establecido para la especie canina. Estos hallazgos vienen dados probablemente por las tendencias hemorrágicas descritas en las fases aguda y, con mayor frecuencia, crónica de la EMC (Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Mylonakis et al. 2004, Neer & Harrus 2006). Entre los 8 perros con sintomatología clínica de EMC, 5 presentaban signos hemorrágicos, principalmente epistaxis (en 3 de los casos), otro de los animales presentaba petequias y equimosis en el momento del diagnóstico y en el otro se describió la presencia de un abundante sangrado durante el celo, de un tiempo de duración excesivamente largo. A pesar de la ausencia

aparente de signos hemorrágicos en los otros tres animales con sintomatología clínica de EMC, todos ellos presentaban anemia en el momento del diagnóstico.

Por otra parte, los perros con EMC en fase clínica presentaban unos menores valores medios relativos y absolutos de eosinófilos que los perros en fase subclínica, aunque estos valores se encontraban en ambos grupos dentro de los rangos de referencia en el perro. En este sentido, diversos autores han descrito la existencia en el curso de la EMC de una eosinopenia (Woody & Hoskins 1991, Sainz 1996a), aunque, como se describió previamente, las alteraciones de la serie blanca sanguínea pueden ser muy variables (Mylonakis et al. 2004).

Además de las diferencias descritas entre los perros con EMC del estudio en fase clínica y en fase subclínica para las variables de la hematología, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos para prácticamente todas las variables del proteinograma. La EMC se caracteriza por conducir en muchos de los casos a la aparición de hiperproteinemia por hipergammaglobulinemia (Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Neer et al. 2002, Mylonakis et al. 2004, Harrus & Waner 2010) y, en este estudio, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para el valor medio de la concentración plasmática de proteínas totales entre los perros sintomáticos y los perros asintomáticos ($p=0,189$), existiendo, sin embargo, diferencias significativas para este valor entre los perros sanos y los perros con EMC, como se discutió previamente. No obstante, a pesar de que la diferencia no es estadísticamente significativa, es de destacar que la concentración de proteínas es superior en los perros con sintomatología clínica (8,143 g/dl) en comparación con los perros asintomáticos (7,066 g/dl). Además, la concentración de albúmina plasmática es significativamente inferior y la concentración de globulinas es significativamente superior en los perros en fase clínica, por lo que el cociente A/G es marcadamente inferior en estos perros en comparación con los que se encuentran en la fase subclínica. Entre las fracciones de globulinas, destaca la menor concentración de α_2 y la mayor concentración de γ en los perros sintomáticos. Por lo tanto, los perros que se encuentran en fase clínica de la EMC parecen mostrar mayores alteraciones hematológicas y del proteinograma que los perros asintomáticos. Por otra parte, las alteraciones laboratoriales observadas parecen indicar que, probablemente, la mayoría de los animales con EMC con sintomatología clínica incluidos en este estudio se encontraban en la fase crónica de la enfermedad. En dicha fase crónica la anemia observada suele ser no regenerativa y se ha descrito que, frecuentemente, los animales sufren un incremento marcado de las γ -globulinas y un descenso de la albúmina, pudiendo correlacionarse la magnitud de la elevación de los niveles de globulinas con la duración de la enfermedad (Woody & Hoskins 1991). Precisamente en este trabajo, los perros en fase clínica de la enfermedad presentaban anemia normocítica y normocrómica, características

que sugieren la ausencia de regeneración, e hiperproteinemia por hiperglobulinemia con hipergammaglobulinemia junto con hipoalbuminemia.

A pesar de que se podría esperar la existencia de diferencias entre los perros con sintomatología clínica de EMC y los perros en fase subclínica para algunos de los parámetros del inmunofenotipo evaluados y para la concentración plasmática de algunas citocinas, los resultados de nuestro estudio no han puesto de manifiesto diferencias significativas para un nivel de confianza del 95% en ninguna de estas variables. En la leishmaniosis canina, con la que la EMC comparte ciertas características, se ha asociado la presencia de una elevada proporción de linfocitos T CD8+ en sangre periférica con una enfermedad asintomática y con una baja carga parasitaria (Reis et al. 2006). Asimismo, los perros con leishmaniosis que carecen de síntomas clínicos parecen presentar mayores niveles de TNF- α que los sintomáticos (Pinelli et al. 1995). En nuestro estudio cabe destacar que, aunque no se han alcanzado valores de p que sean estadísticamente significativos en la comparación de los valores relativo y absoluto de linfocitos B sanguíneos entre los perros en fase subclínica y los perros en fase clínica de la EMC, pueden observarse diferencias próximas a la significación (p=0,140 en el caso del valor relativo de estas células y p=0,165 en el caso del valor absoluto). Los animales con sintomatología clínica muestran menores valores medios relativo (10,43%) y absoluto (251,34 linfocitos B/ μ l) que aquellos en fase subclínica (15,13% y 386,25 linfocitos B/ μ l, respectivamente). Si estos resultados de recuentos de linfocitos B sanguíneos superiores en los animales que no muestran sintomatología fuesen confirmados mediante nuevos estudios, podrían corroborar el que esta población celular ejerza en el curso de la infección por *Ehrlichia* spp. importantes labores defensivas, probablemente mediante la secreción de citocinas y la estimulación de subpoblaciones linfocitarias de tipo T CD4+ específicas frente al agente infeccioso (Yager et al. 2005, Bitsaktsis et al. 2007). Sin embargo, este mismo hallazgo también podría venir dado por la circulación de las células inmunitarias entre los diferentes órganos y tejidos del animal, que podrían conducir a una mayor presencia de linfocitos B y células plasmáticas en riñón, bazo o médula ósea en las fases clínicas de la EMC, reflejándose en menores recuentos sanguíneos de estas células, que podrían encontrarse sintetizando elevadas cantidades de inmunoglobulinas responsables de la inmunopatogenia de la enfermedad (Reardon & Pierce 1981a, Harrus et al. 1996a, Harrus et al. 1998c, Codner et al. 1992a, Codner & Maslin 1992b, Harrus et al. 1999, Neer & Harrus 2006).

6.4. ENSAYO CLÍNICO: EVOLUCIÓN DE LAS VARIABLES ANALIZADAS A LO LARGO DEL TIEMPO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE DOXICICLINA EN PERROS SANOS Y EN PERROS CON EMC

La realización de una serie de controles programados en los perros con EMC tras el tratamiento con doxiciclina ha permitido evaluar la evolución de los parámetros estudiados, valorando, por una parte, la capacidad de la doxiciclina, fármaco de elección en la infección por *E. canis* en el perro, para resolver las alteraciones laboratoriales desarrolladas en los animales con EMC y, por otra parte, para conocer si este fármaco es capaz de inducir cambios en las respuestas inmunitarias que, al menos potencialmente, contribuyan a la resolución de la infección. Además, el hecho de que se haya administrado doxiciclina a perros sanos siguiendo el mismo protocolo que en los perros con EMC ha permitido evaluar el efecto de este fármaco sobre el sistema inmunitario canino, confirmando que esta sustancia es capaz de actuar sobre algunas de las poblaciones celulares estudiadas no sólo en los animales enfermos, sino también en perros sanos.

Algunos de los cambios más frecuentemente descritos en el curso de la EMC son aquellos que se producen en la hematología, destacando la aparición de anemia (regenerativa o no regenerativa) y trombocitopenia (Huxsoll et al. 1970, Reardon & Pierce 1981a, Woody & Hoskins 1991, Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Mylonakis et al. 2004, Neer & Harrus 2006). Así, se ha observado que los perros con EMC de este estudio muestran menores valores de hematocrito, concentración de hemoglobina y recuento plaquetar que los perros sanos. Se ha evaluado el efecto que sobre dichos parámetros puede ejercer la doxiciclina, tanto en el caso de los perros sanos como en el caso de los perros con EMC. En los perros con EMC del estudio se ha observado que la administración de doxiciclina conduce a un incremento tanto del número de eritrocitos y de plaquetas, como de la concentración de hemoglobina y de los valores de H.C.M. y C.H.C.M. Este rápido efecto del tratamiento con doxiciclina sobre los parámetros de la serie roja en el curso de la EMC ha sido descrito con anterioridad (Sainz 1996a). El hecho de que en los perros sanos no se produzcan cambios a lo largo del tiempo ni en el recuento eritrocitario, ni en la concentración de hemoglobina, ni en el V.C.M. conduce a pensar que la evolución favorable de dichos parámetros en los perros con infección por *E. canis* se debe al efecto antimicrobiano del fármaco, es decir, a su efecto sobre el agente patógeno, y no a un efecto directo de la doxiciclina sobre la serie roja sanguínea. Estos resultados apoyan lo descrito por Van den Bogert y Kroon en 1982 en un estudio de la influencia de

la oxitetraciclina sobre la recuperación de anemia grave en ratas, no habiendo observado estos autores efecto alguno sobre la proliferación eritroide de esta tetraciclina (Van den Bogert & Kroon 1982). Sin embargo, los valores de H.C.M., C.H.C.M. y de recuento plaquetar van aumentando progresivamente no sólo en los perros con EMC, sino también en aquellos perros sanos del estudio a los que se les administró doxiciclina, lo que podría indicar que este fármaco puede inducir un cierto efecto proliferativo sobre la serie plaquetar y conducir a un incremento de la concentración de hemoglobina corpuscular en la serie eritroide. No se han hallado en la bibliografía estudios previos del efecto de la doxiciclina u otras tetraciclinas sobre estos parámetros. El mecanismo por el que este fármaco puede inducir estos cambios podría implicar a sus efectos sobre la síntesis de citocinas, ya que, como se describió en la revisión bibliográfica, algunas de ellas, como el Factor de Células Progenitoras, la IL-3 y la IL-7, son mediadores de la hematopoyesis (Abbas et al. 2008d). Sería necesario llevar a cabo nuevos estudios que permitan esclarecer este punto.

En cuanto a la serie blanca sanguínea, en el curso de la EMC se ha descrito tanto leucopenia como leucocitosis, siendo ésta última menos frecuente (Reardon & Pierce 1981a), así como neutropenia, linfocitosis o linfopenia y monocitosis (Mylonakis et al. 2004). Sin embargo, estas alteraciones de los glóbulos blancos pueden ser muy variables en la infección por *E. canis* en el perro y, de hecho, en este trabajo no se han hallado diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en los recuentos leucocitarios entre los perros sanos y los perros con EMC. En cambio, frecuentemente se ha descrito en la bibliografía la existencia de una serie de efectos de las tetraciclinas sobre algunas poblaciones celulares de la línea blanca (Forsgren et al. 1974, Thong & Ferrante 1979, Thong & Ferrante 1980, Welch et al. 1981, Van den Bogert & Kroon 1982, Gabler & Creamer 1991). En concreto, se ha descrito que estos fármacos son capaces de afectar a la actividad de los neutrófilos mediante la inhibición de la quimiotaxis, fagocitosis, degranulación y generación de radicales libres de oxígeno (Forsgren et al. 1974, Welch et al. 1981, Forsgren & Schmeling 1977, Gabler & Creamer 1991). No se han hallado referencias bibliográficas del efecto de las tetraciclinas sobre la proliferación de los neutrófilos y, sin embargo, en este trabajo se han observado ciertos cambios en esta población tanto en los perros sanos como en los perros con EMC. Concretamente, estas células tienden a disminuir durante el tratamiento con doxiciclina, no resultando estadísticamente significativo este descenso, y, posteriormente, tienden a aumentar progresivamente.

Sin duda, la mayor parte de los estudios llevados a cabo para tratar de esclarecer el potencial efecto inmunomodulador (o inmunosupresor) de las tetraciclinas se han realizado sobre poblaciones linfocitarias, habiéndose descrito la existencia de una inhibición de las

respuestas linfoproliferativas bajo el efecto de la doxiciclina, tetraciclina y oxitetraciclina (Thong & Ferrante 1979, Thong & Ferrante 1980). La principal población que resulta afectada por una inhibición de su proliferación por el efecto de las tetraciclinas parece ser la constituida por las células T (Van den Bogert & Kroon 1982, Kloppenburg et al. 1995b), como se discutirá más adelante. Los resultados de nuestro trabajo apoyan la posible existencia de un efecto inhibitor de la doxiciclina sobre la proliferación de los linfocitos sanguíneos, células que, aunque tienden a aumentar inicialmente durante el tratamiento, disminuyen posteriormente de modo paulatino.

Se ha sugerido que, al contrario que para los linfocitos, las tetraciclinas pueden ejercer efectos inmunoestimulantes sobre los monocitos/macrófagos, siendo capaces de estimular su síntesis de citocinas (Kloppenburger et al. 1996). Sin embargo, no hemos hallado cambios estadísticamente significativos ni en el valor absoluto ni en el valor relativo de los monocitos sanguíneos a lo largo del tiempo tras la administración de doxiciclina en los perros sanos ni en los perros con EMC. Sería interesante completar este estudio evaluando los posibles efectos de este fármaco sobre los macrófagos y sobre la síntesis de citocinas por estas células.

No se ha descrito en la bibliografía ningún efecto sobre los basófilos sanguíneos de la infección por *E. canis* ni de la administración de tetraciclinas. Sin embargo, en nuestro estudio los perros con EMC presentan mayores valores de basófilos en sangre que los perros sanos, tanto en valor absoluto como en valor relativo, si bien siempre se han encontrado dentro de los rangos de referencia para la especie canina. Además, aunque en los perros sanos no se han encontrado cambios significativos en el tiempo para estas células, en el caso de los perros con EMC se ha observado que se produce un brusco descenso de estas células entre el día 0 y el día 30. Al no producirse este efecto en los perros sanos tratados con doxiciclina, parece que dicho efecto se debe a la acción del fármaco sobre el agente patógeno, y no a un efecto directo sobre esta población celular. En este sentido, cabe destacar el hecho de que los basófilos parecen ejercer papeles esenciales en múltiples modelos de inmunidad e inflamación dependientes de citocinas de tipo 2, tanto agudos como crónicos, habiéndose establecido que se trata de importantes células presentadoras de antígeno que inducen la diferenciación de los linfocitos T hacia la subpoblación Th2 y que poseen importantes funciones en la defensa del hospedador frente a diversas parasitosis, entre las que destacan las producidas por helmintos (Mitre et al. 2004, Cadman & Lawrence 2010, Maddur et al. 2010, Yoshimoto 2010). Por lo tanto, y aunque sería necesario llevar a cabo nuevos estudios que permitan profundizar en el papel de los basófilos en las infecciones por *Ehrlichia* spp., es posible que el descenso en el número de estas células que se ha observado tras el tratamiento con doxiciclina en los perros con EMC de este estudio disminuya la diferenciación de los linfocitos T hacia la

subpoblación Th2, favoreciendo en cambio la diferenciación hacia Th1, y disminuya, asimismo, la síntesis de citocinas clásicamente consideradas de tipo 2, especialmente la IL-4, por parte de los basófilos sanguíneos. El desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo 1 favorecería la eliminación de *E. canis* del organismo.

La EMC puede conducir a la aparición de una serie de cambios en la bioquímica sanguínea, entre los que destacan la hiperglobulinemia, generalmente debida a una gammapatía policlonal, aunque también puede ser monoclonal, hipoalbuminemia e incremento de las enzimas hepáticas y/o de la creatinina (Hibler et al. 1986, Breitschwerdt et al. 1987, Woody & Hoskins 1991, Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Neer et al. 2002, Mylonakis et al. 2004). En este trabajo no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en los valores plasmáticos de glucosa, urea, creatinina y GPT entre los perros sanos y los perros con EMC, probablemente debido a la baja frecuencia de presentación de alteración en estos parámetros. Además, no se han observado cambios en el tiempo ni en los perros sanos a los que se les administró doxiciclina ni en los perros con EMC que fueron tratados con este fármaco para los valores de glucosa, urea y GPT. Sin embargo, la creatinina plasmática tiende a disminuir en ambas poblaciones caninas desde el inicio del tratamiento, siendo más marcado este descenso entre los días 90 y 180. En el caso de los perros con EMC, aunque el valor de la creatinina se encuentra dentro del rango fisiológico para la especie, es probable que se estuviese produciendo una cierta proteinuria, de acuerdo con lo descrito por Codner y Maslin en 1992 en un trabajo que mostraba la existencia de proteinuria de forma temprana en el curso de la EMC debida a la existencia de infiltrados periglomerulares y perivasculares de células plasmáticas (Codner & Maslin 1992b). El tratamiento con doxiciclina podría haber disminuido la concentración de creatinina plasmática al actuar de forma directa sobre el agente causal de las alteraciones que conducían a esa proteinuria y, de forma indirecta, al incremento de la creatinina. Por otra parte, el hecho de que se haya observado el mismo efecto sobre el valor de la creatinina en los perros sanos sugiere la posible existencia de un efecto directo de la doxiciclina sobre las células renales y, en este sentido, cabe destacar los trabajos publicados por Kucuk y colaboradores y por Ihtiyar y colaboradores en 2009 en los que se describe un papel protector de la doxiciclina sobre el tejido renal en modelos experimentales de daño por reperfusión en isquemia renal en ratas (Kucuk et al. 2009, Ihtiyar et al. 2009). La isquemia renal y el daño por la reperfusión posterior parece ser una de las principales causas de fallo renal agudo y, probablemente, de algunas formas de enfermedad crónica renal. Estos investigadores sugieren que la doxiciclina es capaz de reducir el daño oxidativo y facilitar la reparación renal mediante la disminución de los niveles de citocinas pro-inflamatorias (concretamente IL-2, IL-6, IL-1 β y TNF- α) y la inhibición de la actividad de la MMP-2 y describen la existencia de menores valores de

creatinina en los animales a los que se les administró doxiciclina en comparación con aquellos a los que no se les administró.

De acuerdo con otros estudios previos (Harrus et al. 1997b, Frank & Breitschwerdt 1999, Neer et al. 2002, Mylonakis et al. 2004, Harrus & Waner 2010), en nuestro trabajo hemos hallado en los perros con EMC hiperproteinemia debida a un incremento de las γ -globulinas. Asimismo, se ha encontrado un menor valor de albúmina plasmática y del cociente A/G y una mayor concentración de globulinas en estos animales que en los perros sanos. Tras la administración de doxiciclina, se observa que las γ -globulinas tienden a disminuir de forma progresiva hasta finalizar el estudio, y este descenso es mucho más marcado en el caso de los perros con EMC. De forma estrechamente relacionada con este descenso de las γ -globulinas se produce en los perros con EMC un incremento paulatino del cociente A/G. Se ha descrito en la bibliografía que los valores de albúmina y globulinas suelen normalizarse en unos 3 a 9 meses tras el inicio del tratamiento (Neer & Harrus 2006). En este descenso de las globulinas probablemente influye el descenso de la producción de anticuerpos específicos frente a *E. canis*, pero debe tenerse en cuenta que intervienen además otros factores, ya que la hiperglobulinemia no se debe únicamente a los anticuerpos específicos frente al agente (Reardon & Pierce 1981a, Harrus et al. 1996a, Harrus et al. 1999, Neer & Harrus 2006). En cuanto a los perros sanos, destaca el hallazgo en este estudio de un descenso y de un incremento estadísticamente significativos en el porcentaje de albúmina plasmática y de β -globulinas, respectivamente, entre los días 30 y 90 en los perros sanos. En el caso de las β -globulinas, la concentración también aumenta en este período, por lo que probablemente el descenso del porcentaje de albúmina se deba realmente a un aumento de esta fracción de globulinas. A su vez, en el aumento de la fracción de las β -globulinas puede influir el incremento que se produce en la subpoblación de linfocitos B en los perros sanos del estudio, hecho que será discutido más adelante.

Algunas de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas han sufrido modificaciones a lo largo del tiempo que ha durado el estudio, bien en el grupo de perros sanos, bien en el grupo de perros con EMC o bien en ambos. Se han observado cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de linfocitos T (CD3+) en los diferentes controles realizados, destacando el descenso que se produce entre los días 0 y 30 del estudio tanto en los perros sanos como en los perros con EMC. De forma global, se puede observar una disminución progresiva en esta población linfocitaria tras el inicio del tratamiento con doxiciclina. Este descenso, sobre todo en el valor absoluto, se produce de manera más marcada en los perros con EMC, que partían de valores significativamente superiores a los de los perros sanos. El hecho de que se produzca el mismo efecto en todos los perros a los que se les administró doxiciclina, sean sanos o con infección por *E. canis*, sugiere que el descenso de esta población de linfocitos T se debe a un efecto directo del fármaco sobre

esta población celular. Estos hallazgos corroboran lo descrito previamente por otros autores que establecían que la oxitetraciclina, la minociclina y la doxiciclina son capaces de inhibir la proliferación de células T (Van den Bogert & Kroon 1982, Kloppenburg et al. 1995b) o, incluso, de inducir su eliminación mediante la interacción Fas/Fas ligando (Liu et al. 1999). Nuestros estudios no permiten determinar el mecanismo por el que se produce este descenso en la población de linfocitos T sanguíneos, pero ofrecen una confirmación *in vivo* del efecto de la doxiciclina en un modelo animal en el que la farmacocinética es similar a la descrita en el hombre.

En el caso del recuento absoluto de los linfocitos Th (CD3+CD4+) en sangre periférica, su comportamiento es similar en ambas poblaciones caninas estudiadas, con un leve incremento entre el día 0 y el 30 y un descenso progresivo posterior hasta finalizar el estudio. No obstante, debe tenerse en cuenta que ni el valor porcentual ni el valor absoluto de estas células han mostrado cambios que sean estadísticamente significativos. Como se describió en la revisión bibliográfica de esta tesis doctoral, en general, en la respuesta inmunitaria protectora desarrollada en el curso de la infección por *Ehrlichia* spp. y otras bacterias de la familia Anaplasmataceae parecen jugar un papel dominante las células T CD4+ productoras de citocinas de tipo 1, que conducen al desarrollo de una inmunidad de base celular. Por este motivo, se podría pensar que el hecho de que la doxiciclina induzca un descenso de la población de linfocitos T (CD3+) podría ir en detrimento de la eliminación de este agente patógeno. Sin embargo, aunque sea de una forma discreta, se observa que dentro de la población de células T, los linfocitos Th aumentan en el primer mes de tratamiento. Además, es importante recalcar que en nuestro estudio no se ha establecido el tipo concreto de linfocitos Th, sino que se ha medido la cantidad de linfocitos T que expresan CD4 en su superficie. Esto hace que no sea posible descartar ni confirmar con nuestros resultados que la doxiciclina sea capaz de inducir una proliferación selectiva de los linfocitos Th1, hecho que favorecería la eliminación de *E. canis* del organismo. No se ha hallado en la bibliografía ningún estudio que haya evaluado el efecto de la doxiciclina ni otras tetraciclinas sobre las subpoblaciones de linfocitos Th.

Como se discutió previamente, los perros con EMC muestran mayores porcentajes y valores absolutos de linfocitos Tc (CD8+) que los perros sanos. Tras la administración de doxiciclina y la realización de los controles pertinentes, el estudio estadístico de los datos ha mostrado que esta variable se comporta a lo largo del tiempo de forma similar en el grupo de perros con EMC y en el grupo de perros sanos, sin hallarse, además, cambios en el tiempo en el valor porcentual ni en el valor absoluto. Sin embargo, si se observan las tablas 82A y 82B y el gráfico 36 del apartado de resultados de esta tesis, se puede comprobar que en los perros sanos hay una tendencia a mantenerse constante estos valores de linfocitos Tc, mientras que en los perros con EMC, esta población sufre un descenso

progresivo, aunque no llega a ser estadísticamente significativo. Debido a que en los perros sanos a los que se les administró doxiciclina los cambios en esta población celular son casi inexistentes, podría deducirse que el descenso de los linfocitos Tc en sangre periférica de los perros con EMC tras el tratamiento con este fármaco se debe a su efecto antimicrobiano. De hecho, se ha sugerido que, aunque las células T CD8+ juegan un cierto papel en la protección frente a las infecciones ehrlichiales (Feng & Walker 2004, Thirumalapura et al. 2008, Thirumalapura et al. 2009), estas células son también responsables en parte de la inmunopatogenia de la enfermedad (Bitsaktsis & Winslow 2006, Ismail et al. 2007). En este sentido, una evolución favorable post-tratamiento con la eliminación del agente causal podría asociarse con una modulación de la respuesta inmunitaria, con una ligera disminución de este tipo celular. En este sentido, cabe destacar el estudio de Lindeman y colaboradores publicado en 2009 en el que se evaluó el efecto de la administración de doxiciclina durante 2 semanas a dosis baja, media y alta a pacientes humanos con aneurismas aórticos abdominales avanzados. Se observó que el tratamiento con este fármaco resultaba en una reducción de la inflamación vascular, concretamente en un descenso del contenido de la pared aórtica en neutrófilos y linfocitos Tc. A este efecto se añadía un descenso en la concentración de IL-6 e IL-8, entre otros mediadores proteicos, así como a un descenso en los niveles de MMP-9 (Lindeman et al. 2009).

De forma estrechamente relacionada con lo descrito hasta ahora, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento del cociente CD4/CD8 entre los perros sanos y los perros con EMC del estudio, ni tampoco se han encontrado cambios estadísticamente significativos a lo largo del tiempo para esta variable. Sin embargo, en los perros con EMC, tras la administración de doxiciclina se observa una tendencia al alza en este cociente, lo que estaría relacionado principalmente con el descenso de la subpoblación de linfocitos Tc en estos animales. De hecho, se ha descrito en la bibliografía la existencia de una inversión del índice CD4/CD8 en perros con infección por *E. canis* debida a un descenso de los linfocitos Th (CD4+) y a un incremento de los linfocitos Tc (CD8+) (Frank & Breitschwerdt 1999, Heeb et al. 2003, Lorente et al. 2008).

Durante mucho tiempo se había asumido que los anticuerpos y los linfocitos B carecían de un papel protector en la infección por *Ehrlichia* spp. y, sin embargo, cada vez más autores consideran que es necesario que las defensas que se pongan en marcha en estas infecciones sean una combinación de respuestas celulares y humorales (Kaylor et al. 1991, Messick & Rikihisa 1994, Lee & Rikihisa 1997, Sun et al. 1997, Winslow et al. 2000, Feng & Walker 2004, Yager et al. 2005, Bitsaktsis et al. 2007). En este trabajo se ha observado que, tras la administración de doxiciclina a los perros con EMC, se produce un incremento progresivo del valor absoluto de estas células en sangre periférica desde el día

0 hasta el día 90, siendo más marcado este incremento durante el primer mes post-tratamiento, para posteriormente disminuir a los valores iniciales el día 180. Este aumento inicial de los linfocitos B en perros con EMC podría encontrarse relacionado con la eficacia terapéutica de la doxiciclina en la lucha frente a esta infección, lo que podría asociarse con una liberación masiva de antígenos ehrlichiales y la consiguiente proliferación de clones linfocitarios específicos.

En cuanto a los perros sanos, se produce un incremento marcado de esta población linfocitaria en sangre periférica entre los días 0 y 30 del estudio. El incremento inicial de los linfocitos B podría relacionarse, a su vez, con el aumento de las β -globulinas plasmáticas en los perros sanos entre los días 30 y 90 del estudio, ya que en esta fracción proteica pueden incluirse algunos subtipos de inmunoglobulinas. El hecho de que los linfocitos B se vean afectados tras la administración de doxiciclina no sólo en los perros con EMC, sino también en los perros sanos, conduce a pensar que la doxiciclina ejerce un efecto directo sobre esta población, estimulando su proliferación. No se han hallado en la bibliografía estudios previos del efecto de este fármaco sobre los linfocitos B *in vivo* en la especie canina. En 1982, Van den Bogert y Kroon describieron un efecto inhibitorio de la oxitetraciclina sobre la proliferación de linfocitos T en ratas, no hallando efecto alguno sobre los linfocitos B. Otros estudios han mostrado que la doxiciclina es capaz de inhibir la síntesis de inmunoglobulinas y el cambio de clase en las células B de ratón *in vitro* (Kuzin et al. 2001). Se hace necesario llevar a cabo nuevos estudios sobre el efecto de las tetraciclinas en los linfocitos B en la especie canina, tanto *in vitro* como *in vivo*, para tratar de esclarecer el efecto de estas sustancias sobre esta población celular.

Por otra parte, se han encontrado cambios estadísticamente significativos en la expresión de CMH de clase II en la superficie linfocitaria de los perros de nuestro estudio a lo largo del tiempo, produciéndose una disminución del porcentaje de linfocitos CMHII+ desde el día 0 hasta el día 180 tanto en los perros con EMC como en los perros sanos tras la administración de doxiciclina. Además, aunque no se han encontrado cambios estadísticamente significativos, el valor absoluto de estos linfocitos también disminuye progresivamente. Estos resultados sugieren una influencia directa de la doxiciclina sobre la expresión de estas moléculas por parte de los linfocitos sanguíneos. En este sentido, cabe destacar la descripción por parte de Nikodemova y colaboradores en 2007 de un efecto inhibitorio de la minociclina de la expresión de CMHII sobre la superficie de la microglia del sistema nervioso central en encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en ratas, un modelo animal de esclerosis múltiple. La administración de minociclina disminuye significativamente la gravedad del curso clínico de la EAE y se ha sugerido que este efecto puede estar mediado, al menos en parte, por la inhibición de la minociclina de la expresión de CMHII en la microglia (Nikodemova et al. 2007). El hecho de que la

minociclina, una tetraciclina estrechamente relacionada con la doxiciclina, sea capaz de ejercer este efecto sobre células inmunitarias del sistema nervioso central, unido a la observación en este trabajo de un descenso del porcentaje de linfocitos que expresan CMHII en su superficie tras la administración de doxiciclina, apuntan a un posible efecto de esta familia de fármacos sobre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

Entre los linfocitos CD3-CD21- se incluyen las células NK aunque, como se comentó previamente, pueden estar incluidos también restos celulares que no sean realmente linfocitos. Aunque no se han hallado cambios estadísticamente significativos en el tiempo para los valores porcentual y absoluto en esta población de células no T no B, se observa una tendencia a incrementarse desde el día 0 al día 30 en ambos grupos de perros. Parece, por tanto, que la doxiciclina es capaz de ejercer un cierto efecto estimulante de la proliferación de estas células en sangre periférica en los primeros días tras su administración, lo que podría ser beneficioso en la lucha del hospedador frente a *E. canis*, ya que estas células NK son productoras de diferentes citocinas, entre ellas IFN- γ (Schroder et al. 2004, Abbas et al. 2008d, Chen & Liu 2009), que está implicado en la respuesta protectora en las infecciones ehrlichiales (Feng et al. 1994, Akkoyunlu & Fikrig 2000, Waner et al. 2001, Martin et al. 2001, Bitsaktsis et al. 2004). Además, estos linfocitos son importantes reguladores de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Lunemann et al. 2009), por lo que su actuación en las infecciones ehrlichiales podría contribuir a la resolución de las alteraciones del sistema inmunitario producidas como consecuencia de la propia infección.

A pesar de la descripción en la bibliografía de un efecto inhibitorio de la síntesis de las citocinas TNF- α (Kloppenburger et al. 1995b, Chung et al. 2008), IFN- γ (Kloppenburger et al. 1995b, Chung et al. 2008), IL-6 (Zanjani et al. 2006) e IL-10 (Chung et al. 2008), entre otras, por parte de las tetraciclinas, no hemos observado este efecto en los perros sanos ni en los perros con EMC a los que se les administró doxiciclina. No se han encontrado cambios estadísticamente significativos de la concentración de estas citocinas a lo largo del tiempo del estudio, salvo por un marcado incremento de la concentración plasmática de TNF- α el día 30, para disminuir bruscamente a los valores iniciales el día 90, únicamente en los perros sanos. Además, y aunque de un modo no significativo estadísticamente, se ha observado que las demás citocinas evaluadas (IFN- γ , IL-6 e IL-10) también tienden a aumentar en los perros sanos durante el primer mes del estudio. Este incremento podría deberse a un efecto de la doxiciclina no descrito, si bien no se pueden descartar otros factores ambientales que hayan afectado a la síntesis de citocinas, ya que los cambios más marcados, sobre todo en el caso de la evolución de la concentración plasmática de TNF- α , se han producido en el grupo de perros sanos de raza Beagle que

convivían en el animalario del HCVC, no observándose en cambio, en los perros sanos de otras razas y otros hábitats. Tampoco puede descartarse que la doxiciclina produzca un incremento del TNF- α únicamente en los perros de raza Beagle por sus características inmunitarias.

Por otra parte, debe recordarse que las citocinas actúan principalmente de forma local, por lo que el hecho de que no se haya observado un descenso en sus concentraciones plasmáticas tras la administración de doxiciclina no permite descartar que se haya producido un efecto de este fármaco en la síntesis de estos mediadores que no se haya reflejado en sus niveles sanguíneos.

7. CONCLUSIONES

A partir del análisis y discusión de los resultados obtenidos y atendiendo a los objetivos planteados al inicio de este trabajo de investigación, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1^a. Quedan estimados como valores de referencia del inmunofenotipo para la población canina sana, con un intervalo de confianza del 95%:

- con respecto al total de linfocitos sanguíneos, unos porcentajes medios de $89,01 \pm 1,55\%$ para los linfocitos que expresan CMH de clase II en su superficie, de $65,69 \pm 1,79\%$ para los linfocitos T, de $37,91 \pm 1,43\%$ para los linfocitos Th, de $19,75 \pm 2,11\%$ para los linfocitos Tc, de $18,41 \pm 2,07\%$ para los linfocitos B y de $15,15 \pm 1,45\%$ para los linfocitos no T/no B.
- unos recuentos medios por microlitro de sangre periférica de $2538,80 \pm 288,25$ para los linfocitos que expresan CMH de clase II en su superficie, de $1869,25 \pm 163,28$ para los linfocitos T, de $1080,14 \pm 116,72$ para los linfocitos Th, de $506,19 \pm 52,28$ para los linfocitos Tc, de $527,57 \pm 95,02$ para los linfocitos B y de $417,55 \pm 49,85$ para los linfocitos no T/no B.
- un valor medio del cociente de linfocitos sanguíneos Th/Tc (CD4+/CD8+) de $2,09 \pm 0,28$.

2^a Las concentraciones plasmáticas de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α en la población canina sana presentan unos valores medios de 47,85 pg/ml, 47,08 pg/ml, 0,55 pg/ml y 13,2 pg/ml, respectivamente. Las importantes desviaciones estadísticas encontradas, unidas a la existencia de valores nulos en algunos casos, confirman la elevada variabilidad de dichas concentraciones en perros sanos.

3^a. En la población canina sana existen variaciones en el inmunofenotipo en función de la edad del animal, comprobándose descensos significativos a partir del primer año en los valores absolutos de linfocitos T, linfocitos Th, linfocitos B y linfocitos que expresan CMHII en su superficie, así como en el valor porcentual de linfocitos Th y en el cociente CD4/CD8. Por el contrario, el porcentaje de linfocitos Tc aumenta a partir del primer año de vida.

4^a. En la población canina sana estudiada existen variaciones en el inmunofenotipo y en la concentración plasmática de algunas citocinas en función de la raza, destacando un mayor porcentaje de linfocitos T, un mayor valor porcentual y absoluto de linfocitos Tc, un menor porcentaje de linfocitos B, un menor cociente CD4/CD8 y una menor

concentración plasmática de IL-6 en los perros de raza Pastor Alemán que en los perros de raza Beagle, si bien la influencia de otras variables, como la edad, el hábitat, la alimentación o la aptitud, sobre estos resultados no puede descartarse totalmente.

5ª. En el curso de la ehrlichiosis monocítica canina se observan cambios en el inmunofenotipo en comparación con los animales sanos, destacando la existencia en los perros con infección por *Ehrlichia canis* de un mayor valor relativo de linfocitos T y mayores valores relativo y absoluto de linfocitos Tc y, en cambio, un menor valor relativo de linfocitos Th. Del mismo modo, los valores porcentual y absoluto de linfocitos Tc son superiores y el valor porcentual de linfocitos Th es inferior en los perros con ehrlichiosis en comparación con los perros afectados de patologías gastrointestinales, mucocutáneas, oncológicas y traumatológicas. Además, los perros con dichas patologías presentan menores recuentos absolutos de linfocitos T y de linfocitos que expresan CMH de clase II en su superficie que los perros con ehrlichiosis. Por otro lado, los perros afectados de patologías oncológicas presentan menores recuentos absolutos de linfocitos Th y B que los perros sanos.

6ª. Los perros con ehrlichiosis monocítica canina en una fase clínica (fase aguda o fase crónica de la enfermedad) presentan mayores alteraciones hematológicas y del proteinograma que los perros con ehrlichiosis monocítica canina que se encuentran en la fase subclínica. En este sentido, destacan la existencia de un menor recuento eritrocitario, valor hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento porcentual y absoluto de eosinófilos, concentración plasmática de albúmina y de α 1- y α 2-globulinas y cociente Albúmina/Globulinas y, por el contrario, una mayor concentración de globulinas totales y de γ -globulinas en la ehrlichiosis sintomática que en la ehrlichiosis asintomática. Sin embargo, las diferencias observadas en el inmunofenotipo y en la concentración plasmática de las citocinas estudiadas no han alcanzado el grado de significación estadística en función de la fase de la enfermedad.

7ª. Tras la administración de doxiciclina, tanto a perros sanos como a perros con ehrlichiosis monocítica, a una dosis de 10 miligramos por kilogramo de peso cada 24 horas durante 28 días por vía oral se produce una serie de modificaciones, similares para ambos grupos, en varios parámetros hematológicos y bioquímicos, en algunas poblaciones linfocitarias y en la concentración plasmática de citocinas, lo que sugiere un efecto del fármaco en la especie canina independiente de sus efectos antimicrobianos. En concreto, se comprueba en ambas poblaciones la existencia de un incremento de los valores de H.C.M. y C.H.C.M., recuento plaquetar, valor porcentual de neutrófilos, concentración plasmática de α 2-globulinas y valor absoluto de linfocitos B. Además, tras la

administración del fármaco se induce un descenso en el valor de la creatinina plasmática, en el porcentaje de linfocitos sanguíneos y en los valores relativos de linfocitos T y de aquellos que expresan CMH de clase II en su superficie.

8^a. El efecto antimicrobiano de la doxiciclina en el tratamiento de la ehrlichiosis monocítica canina a dosis de 10 miligramos por kilogramo de peso cada 24 horas durante 28 días por vía oral conduce a una normalización de los parámetros biopatológicos alterados, confirmándose dentro de los 6 primeros meses tras el inicio del tratamiento un incremento del recuento eritrocitario y de concentración de hemoglobina, un descenso del recuento relativo y absoluto de basófilos sanguíneos y un incremento del cociente Albúmina/Globulinas. Estos efectos no se presentan en los perros sanos tratados con doxiciclina.

8. RESUMEN

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una patología causada por la bacteria *Ehrlichia canis*, cuyo vector es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. A pesar de que la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador en el curso de la infección parece influir de manera decisiva en el cuadro clínico y en las alteraciones laboratoriales y anatomopatológicas que se presentan, los conocimientos existentes por el momento sobre la inmunopatogenia de la enfermedad son escasos. Este hecho condujo, al inicio de este trabajo de investigación, a tratar de evaluar el inmunofenotipo y el patrón de secreción de citocinas en perros con infección natural por *E. canis*.

Con el fin de evaluar las posibles alteraciones existentes en los perros afectados por esta patología, en primer lugar fue necesario caracterizar el inmunofenotipo mediante citometría de flujo (considerando las poblaciones linfocitarias T, Th, Tc, B, noT/noB y aquellas que expresan CMH de clase II en su superficie) y el patrón de secreción de citocinas (IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α) mediante ELISA en 47 perros sanos de distintas edades, sexos y razas, lo que nos permitió disponer de nuestros propios valores de referencia. El estudio de estos parámetros directamente relacionados con el sistema inmunitario canino mostró que ciertas variables fisiológicas, como la edad y la raza del animal, influyen sobre dichos parámetros. Entre los cambios observados cabe destacar la existencia de un descenso estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 95% en el número total de linfocitos sanguíneos y en los recuentos absolutos de linfocitos T, Th, B y linfocitos que expresan CMH de clase II en su superficie, así como una disminución del porcentaje de linfocitos Th y del cociente CD4/CD8 con la edad del perro. Por el contrario, el porcentaje de linfocitos Tc tiende a aumentar con la edad en la especie canina.

Una vez establecidos los valores de referencia para estos parámetros en la especie canina, nos propusimos evaluar las posibles alteraciones existentes en los perros con infección natural por *E. canis* (en concreto en 37 animales) y en perros con otras patologías (en 83 animales), comprobándose que en los perros con EMC se produce un incremento significativo para un nivel de confianza del 95% con respecto a los valores medios de los perros sanos en los porcentajes de linfocitos T y Tc y en el valor absoluto de linfocitos Tc, siendo menor, en cambio, el porcentaje de linfocitos Th. Además de estos cambios en el inmunofenotipo, se confirmó que los perros con EMC presentan menores valores de hematocrito, concentración de hemoglobina, H.C.M., C.H.C.M. y recuento plaquetario que los perros sanos, así como mayores concentraciones plasmáticas de proteínas totales, menores concentraciones de albúmina y mayores de globulinas (principalmente β - y γ -

globulinas) y menores cocientes Albúmina/Globulinas. Por otra parte, estas alteraciones de la analítica sanguínea básica fueron más marcadas en los perros con EMC en fase clínica (sintomáticos) que en aquellos que se encontraban en la fase subclínica (asintomáticos). Sin embargo, las diferencias observadas en los valores del inmunofenotipo y de concentración plasmática de citocinas entre los animales en fase clínica y los animales en fase subclínica no alcanzaron valores estadísticamente significativos.

El tratamiento de elección de la EMC es doxiciclina a dosis de 10 miligramos por kilogramo de peso cada 24 horas durante 28 días. La doxiciclina es un miembro de la familia de las tetraciclinas y su uso en el tratamiento de ésta y otras enfermedades infecciosas se basa en sus propiedades antimicrobianas. No obstante, parece que esta sustancia puede ejercer otra serie de efectos, entre los que destacan un efecto inmunomodulador y un efecto inhibidor de ciertas metaloproteinasas, por lo que su acción en el curso de la infección por *E. canis* en el perro podría deberse en realidad a dichos efectos sobre el sistema inmunitario, más que a sus propiedades directamente antimicrobianas. En esta tesis doctoral, a través de un ensayo clínico, se ha tratado de evaluar a corto y medio plazo (mediante controles los días 0, 30, 90 y 180) los cambios que se producen en una serie de parámetros biopatológicos (hematología, bioquímica sanguínea básica, proteinograma, inmunofenotipo y concentración de citocinas) tras el tratamiento con doxiciclina, tanto en perros con infección natural por *E. canis* (n=20), como en animales sanos (n=12) a los que se administró el fármaco siguiendo el mismo protocolo. En ambos grupos, perros sanos y perros con EMC, se observó un incremento de los valores de H.C.M. y C.H.C.M., recuento plaquetario, valor porcentual de neutrófilos, α 2-globulinas plasmáticas y recuento de linfocitos B sanguíneos y un descenso en el valor de creatinina plasmática y en los valores porcentuales de linfocitos totales y, en concreto, de los linfocitos T y de aquellos que expresan CMH de clase II en su superficie. Estos resultados permiten sugerir que estos efectos observados en ambas poblaciones caninas son mediados por propiedades no antimicrobianas de la doxiciclina, relacionados con su efecto sobre las poblaciones celulares sanguíneas. En cambio, otra serie de modificaciones de varios parámetros observadas en este estudio sólo se han producido en los perros con infección por *E. canis*, lo que sugiere un efecto derivado de forma directa de la actividad antimicrobiana del fármaco. Entre estos cambios destaca el aumento del recuento eritrocitario y de la concentración de hemoglobina, el descenso de los valores relativo y absoluto de basófilos y el aumento del cociente Albúmina/Globulinas, detectados únicamente tras el tratamiento en perros con EMC.

9. SUMMARY

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is an infectious disease caused by *Ehrlichia canis*, which is transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. Although the immune response developed by the host during the infection appears to influence the clinical signs and laboratory and pathological findings, the immunopathogenesis of the disease remains poorly understood. In the present study, the immunophenotype and cytokine secretion pattern in blood samples of dogs naturally infected by *E. canis* are assessed.

In order to evaluate the potential alterations in dogs affected by this disease, first of all it was necessary to characterize the immunophenotype by the use of flow cytometry (studying the lymphocyte subsets T, Th, Tc, B, CD3-CD21- and the lymphocyte population that expresses MHC class II) and the cytokine secretion pattern (IFN- γ , IL-6, IL-10 and TNF- α) using ELISA tests in 47 healthy dogs of different age, sex and breed. These data allowed us to have our own reference ranges. Some physiological variables, like the age and breed, influence on these parameters. An age-related decline statistically significant ($p < 0,05$) in absolute numbers of lymphocytes, T-cells, Th-cells, B-cells and lymphocytes that express MHC class II and in the percentage of Th cells and the ratio CD4/CD8 has been found, while the percentage of Tc increase with the age.

The knowledge of physiological values for normal canine blood lymphocytes and plasmatic concentration of IFN- γ , IL-6, IL-10 and TNF- α enabled to assess the potential alterations developed in dogs naturally infected by *E. canis* (in 37 animals) and in dogs with other diseases (in 83 animals). The dogs with CME showed an increase in relative values of T cells and Tc cells, and in absolute number of Tc cells, while the percentage of Th cells decreased. In addition to these changes in the immunophenotype, dogs with CME showed lower values of PCV, hemoglobin concentration, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet count, albumin concentration and ratio Albumin/Globulins than healthy dogs. The values of plasmatic protein concentrations and globulins (β - and γ -globulins) were higher in dogs with ehrlichiosis than in healthy dogs. On the other hand, these alterations of the hematology and blood biochemistry were higher in dogs with CME in a clinical phase (symptomatic dogs) than in animals in the subclinical phase of the disease (asymptomatic dogs). However, statistically significant differences between symptomatic and asymptomatic dogs were not detected when evaluating lymphocyte subsets and cytokine concentrations.

Treatment of choice of CME consists of doxycycline at a dosage regimen of 10 mg/kg daily for 28 days. Doxycycline is a member of the tetracyclines family and it is used

in the therapy of this and other infectious diseases because of its antimicrobial properties. However, it is suggested that this drug can exert another kind of effects, like an inhibition of some metalloproteinases and an immunomodulating effect. The effectiveness of the doxycycline in the treatment of *E. canis* infection may be due to these effects in the host immune system, and not only to its antimicrobial properties. In this study it has been tried to assess in short and medium term (days 0, 30, 90 and 180) the changes developed in some parameters of the hematology, biochemistry, protein concentrations, immunophenotype and cytokine concentrations after treatment with doxycycline in dogs with naturally occurring CME (20 dogs) and in a group of healthy animals (12 dogs) that received the same drug regimen. Both canine populations showed an increase in mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet count, neutrophil percentage, α 2-globulins plasmatic concentration and B cells absolute number. A decrease in creatinine value and in the percentages of total lymphocytes, T cells and those lymphocytes that express MHC class II was also detected in both groups. These data suggest that the effects described in the two canine populations of this clinical assay are due to non antimicrobial properties of doxycycline that are closely related with its effects on blood cellular populations. On the other hand, there were other changes in some parameters that only were present in *E. canis* infected dogs. It is suggested that these modifications can be related with the antimicrobial properties of the doxycycline. In this sense, an increase in erythrocyte count, hemoglobin concentration and albumin/globulins ratio and a decline in basophils relative and absolute numbers were detected after therapy in dogs with CME.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008a, "Activación de los linfocitos B y producción de anticuerpos" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, , pp. 215-241.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008b, "Anticuerpos y antígenos" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 75-96.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008c, "Células y tejidos del sistema inmunitario adaptativo" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 47-72.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008d, "Citocinas" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, pp. 267-301.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008e, "Complejo principal de histocompatibilidad" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 97-111.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008f, "Inmunidad frente a microbios" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 351-373.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008g, "Inmunidad Innata" in *Inmunología Celular y Molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 19-46.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008h, "Mecanismos efectores de la inmunidad celular" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 303-320.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008i, "Mecanismos efectores de la inmunidad humoral" in *Inmunología Celular y Molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 321-348.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008j, "Propiedades generales de las respuestas inmunitarias" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 3-17.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2008k, "Técnicas de laboratorio de uso habitual en inmunología" in *Inmunología celular y molecular*, eds. A.K. Abbas, A.H. Lichtman & S. Pillai, Sexta edn, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 525-538.
- Acharya, M.R., Venitz, J., Figg, W.D. & Sparreboom, A. 2004, "Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases", *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, vol. 7, no. 3, pp. 195-208.
- Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusatogui, I., Lopez, L., Rodriguez-Franco, F., Luaces, I., Cortes, O. & Tesouro, M.A. 2004a, "First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain", *Vet Parasitol*, vol. 125, no. 3-4, pp. 365-72.
- Aguirre, E., Tesouro, M.A., Amusatogui, I., Rodriguez-Franco, F. & Sainz, A. 2004b, "Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and a polymerase chain reaction technique", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1026, pp. 103-105.
- Aguirre, E., Ayllon, T., Sainz, A., Amusatogui, I., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F. & Tesouro, M.A. 2009, "Results from an indirect fluorescent antibody test using three different strains of *Ehrlichia canis*", *Veterinary journal (London, England : 1997)*, vol. 182, no. 2, pp. 301-305.
- Akkoyunlu, M. & Fikrig, E. 2000, "Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia", *Infection and immunity*, vol. 68, no. 4, pp. 1827-1833.
- Ameri, M., Wilkerson, M.J., Stockham, S.L., Almes, K.M., Patton, K.M. & Jackson, T. 2010, "Acute megakaryoblastic leukemia in a German Shepherd dog", *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, vol. 39, no. 1, pp. 39-45.
- Amin, A.R., Attur, M.G., Thakker, G.D., Patel, P.D., Vyas, P.R., Patel, R.N., Patel, I.R. & Abramson, S.B. 1996, "A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 24, pp. 14014-14019.

- Amin, A.R., Patel, R.N., Thakker, G.D., Lowenstein, C.J., Attur, M.G. & Abramson, S.B. 1997, "Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline and chemically modified tetracyclines", *FEBS letters*, vol. 410, no. 2-3, pp. 259-264.
- Amusatogui, I., Tesouro, M.A., Kakoma, I. & Sainz, A. 2008, "Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain", *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, vol. 8, no. 6, pp. 797-803.
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J.C. 2006, "Cytotoxic T cells", *The Journal of investigative dermatology*, vol. 126, no. 1, pp. 32-41.
- Anderson, B.E., Dawson, J.E., Jones, D.C. & Wilson, K.H. 1991, "*Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis", *Journal of clinical microbiology*, vol. 29, no. 12, pp. 2838-2842.
- Askonas, B.A. 1975, "Immunoglobulin formation in B lymphoid cells", *Journal of clinical pathology. Supplement (Association of Clinical Pathologists)*, vol. 6, pp. 8-12.
- Asselin-Paturel, C. & Trinchieri, G. 2005, "Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond", *The Journal of experimental medicine*, vol. 202, no. 4, pp. 461-465.
- Ayllon, T., Villaescusa, A., Tesouro, M.A. & Sainz, A. 2009, "Serology, PCR and culture of *Ehrlichia/Anaplasma* species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain", *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 15 Suppl 2, pp. 4-5.
- Bachwich, P.R., Chensue, S.W., Larrick, J.W. & Kunkel, S.L. 1986, "Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 136, no. 1, pp. 94-101.
- Baggio, V., Ott, F., Fischer, R.W., Gram, H., Peele, J., Spreng, D., Schmokel, H. & Jungi, T.W. 2005, "Production of antibodies to canine IL-1beta and canine TNF to assess the role of proinflammatory cytokines", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 107, no. 1-2, pp. 27-39.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. & Palucka, K. 2000, "Immunobiology of dendritic cells", *Annual Review of Immunology*, vol. 18, pp. 767-811.
- Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F.S. & Schlesinger, Y. 2009, "Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection", *Veterinary microbiology*, vol. 136, no. 3-4, pp. 321-325.
- Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A. & Clark, B.J. 2005, "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues", *Physiological genomics*, vol. 21, no. 3, pp. 389-395.
- Barnewall, R.E. & Rikihisa, Y. 1994, "Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron-transferrin", *Infection and immunity*, vol. 62, no. 11, pp. 4804-4810.
- Barnewall, R.E., Rikihisa, Y. & Lee, E.H. 1997, "*Ehrlichia chaffeensis* inclusions are early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor", *Infection and immunity*, vol. 65, no. 4, pp. 1455-1461.
- Baumgarth, N. & Roederer, M. 2000, "A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping", *Journal of immunological methods*, vol. 243, no. 1-2, pp. 77-97.
- Beall, M.J., Chandrashekar, R., Eberts, M.D., Cyr, K.E., Diniz, P.P., Mainville, C., Hegarty, B.C., Crawford, J.M. & Breitschwerdt, E.B. 2008, "Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota", *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, vol. 8, no. 4, pp. 455-464.
- Bellahsene, A. & Forsgren, A. 1985, "Effect of doxycycline on immune response in mice", *Infection and immunity*, vol. 48, no. 2, pp. 556-559.
- Beutler, B. 2004, "Innate immunity: an overview", *Molecular immunology*, vol. 40, no. 12, pp. 845-859.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G. & Breitschwerdt, E.B. 2003, "Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples", *Journal of clinical microbiology*, vol. 41, no. 9, pp. 4172-4177.
- Bitsaktsis, C., Huntington, J. & Winslow, G. 2004, "Production of IFN-gamma by CD4 T cells is essential for resolving ehrlichia infection", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 172, no. 11, pp. 6894-6901.

- Bitsaktsis, C. & Winslow, G. 2006, "Fatal recall responses mediated by CD8 T cells during intracellular bacterial challenge infection", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 177, no. 7, pp. 4644-4651.
- Bitsaktsis, C., Nandi, B., Racine, R., MacNamara, K.C. & Winslow, G. 2007, "T-Cell-independent humoral immunity is sufficient for protection against fatal intracellular ehrlichia infection", *Infection and immunity*, vol. 75, no. 10, pp. 4933-4941.
- Blount, D.G., Pritchard, D.I. & Heaton, P.R. 2005, "Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 108, no. 3-4, pp. 399-407.
- Bohnhorst, J.O., Hanssen, I. & Moen, T. 2002, "Immune-mediated fever in the dog. Occurrence of antinuclear antibodies, rheumatoid factor, tumor necrosis factor and interleukin-6 in serum", *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 43, no. 3, pp. 165-171.
- Bordet, J. & Gengou, O. 1901, "Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des serums antimicrobiens", *Ann De l'Inst Pasteur*, vol. 15, pp. 289-303.
- Borghesi, L. & Milcarek, C. 2007, "Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime?", *Cancer research*, vol. 67, no. 9, pp. 3989-3993.
- Bortnick, S.J., Orandle, M.S., Papadi, G.P. & Johnson, C.M. 1999, "Lymphocyte subsets in neonatal and juvenile cats: comparison of blood and lymphoid tissues", *Laboratory animal science*, vol. 49, no. 4, pp. 395-400.
- Breathnach, R.M., Baker, K.P., Quinn, P.J., McGeady, T.A., Aherne, C.M. & Jones, B.R. 2005, "Clinical, immunological and histopathological findings in a subpopulation of dogs with pododermatitis", *Vet Dermatol*, vol. 16, no. 6, pp. 364-72.
- Breathnach, R.M., Fanning, S., Mulcahy, G., Bassett, H.F., Jones, B.R. & Daly, P. 2006, "Evaluation of Th1-like, Th2-like and immunomodulatory cytokine mRNA expression in the skin of dogs with immunomodulatory-responsive lymphocytic-plasmacytic pododermatitis", *Vet Dermatol*, vol. 17, no. 5, pp. 313-21.
- Breitschwerdt, E.B., Woody, B.J., Zerbe, C.A., De Buyscher, E.V. & Barta, O. 1987, "Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 2-9.
- Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. & Hancock, S.I. 1998a, "Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains", *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 42, no. 2, pp. 362-8.
- Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. & Hancock, S.I. 1998b, "Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*", *J Clin Microbiol*, vol. 36, no. 9, pp. 2645-51.
- Breitschwerdt, E.B., Abrams-Ogg, A.C., Lappin, M.R., Bienzle, D., Hancock, S.I., Cowan, S.M., Clooten, J.K., Hegarty, B.C. & Hawkins, E.C. 2002, "Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 16, no. 6, pp. 642-649.
- Briolant, S., Almeras, L., Belghazi, M., Boucomont-Chapeaublanc, E., Wurtz, N., Fontaine, A., Granjeaud, S., Fusai, T., Rogier, C. & Pradines, B. 2010, "*Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment", *Malaria journal*, vol. 9, pp. 141.
- Brunda, M.J. 1994, "Interleukin-12", *Journal of leukocyte biology*, vol. 55, no. 2, pp. 280-288.
- Byrne, K.M., Kim, H.W., Chew, B.P., Reinhart, G.A. & Hayek, M.G. 2000, "A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 73, no. 2, pp. 167-82.
- Cadman, E.T. & Lawrence, R.A. 2010, "Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection?", *Parasite immunology*, vol. 32, no. 1, pp. 1-19.
- Caldwell, C.W., Everett, E.D., McDonald, G., Yesus, Y.W., Roland, W.E. & Huang, H.M. 1996, "Apoptosis of gamma/delta T cells in human ehrlichiosis", *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 105, no. 5, pp. 640-646.
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martinez, E., Valladares, B., Canavate, C., Requena, J.M., Lopez, M.C., Alvar, J. & Moreno, J. 2008, "Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis", *Vaccine*, vol. 26, no. 15, pp. 1902-1911.

- Carroll, M.C. 2004a, "The complement system in B cell regulation", *Molecular immunology*, vol. 41, no. 2-3, pp. 141-146.
- Carroll, M.C. 2004b, "The complement system in regulation of adaptive immunity", *Nature immunology*, vol. 5, no. 10, pp. 981-986.
- Casadevall, A. 1998, "Antibody-mediated protection against intracellular pathogens", *Trends Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 102-7.
- Casadevall, A. & Pirofski, L.A. 2004, "New concepts in antibody-mediated immunity", *Infection and immunity*, vol. 72, no. 11, pp. 6191-6196.
- Castle, S.C. 2000, "Clinical relevance of age-related immune dysfunction", *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 31, no. 2, pp. 578-585.
- Caswell, J.L., Yager, J.A., Parker, W.M. & Moore, P.F. 1997, "A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis", *Veterinary pathology*, vol. 34, no. 4, pp. 279-287.
- Chabanne, L., Marchal, T., Denerolle, P., Magnol, J.P., Fournel, C., Monier, J.C. & Rigal, D. 1995, "Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP)", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 49, no. 3, pp. 189-198.
- Chabanne, L., Bonnefont, C., Bernaud, J. & Rigal, D. 2000, "Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat)", *Methods Cell Sci*, vol. 22, no. 2-3, pp. 199-207.
- Chambers, H.E. 2007, "Inhibidores de la síntesis de proteínas y otros antibacterianos" in *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*, eds. L.L. Brunton, J.S. Lazo & K.L. Parker, Undécima edn, Mc Graw Hill, Mexico, pp. 1173-1201.
- Chamizo, C., Moreno, J. & Alvar, J. 2005, "Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 103, no. 1-2, pp. 67-75.
- Chapes, S.K. & Ganta, R.R. 2008, "Defining the immune response to *Ehrlichia* species using murine models", *Veterinary parasitology*, vol. 158, no. 4, pp. 344-359.
- Chauvin, C. & Josien, R. 2008, "Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 181, no. 1, pp. 11-16.
- Chen, J. & Liu, X. 2009, "The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications", *Cellular immunology*, vol. 254, no. 2, pp. 85-90.
- Chu, P.G. & Arber, D.A. 2001, "CD79: a review", *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, vol. 9, no. 2, pp. 97-106.
- Chung, D.R., Lee, Y.S. & Lee, S.S. 2008, "Kinetics of inflammatory cytokines in patients with scrub typhus receiving doxycycline treatment", *The Journal of infection*, vol. 56, no. 1, pp. 44-50.
- Clark, R. & Kupper, T. 2005, "Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity", *The Journal of investigative dermatology*, vol. 125, no. 4, pp. 629-637.
- Clemens, M.J. & Elia, A. 1997, "The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function", *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, vol. 17, no. 9, pp. 503-524.
- Cobbold, S. & Metcalfe, S. 1994, "Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW)", *Tissue antigens*, vol. 43, no. 3, pp. 137-154.
- Codner, E.C. & Farris-Smith, L.L. 1986, "Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 189, no. 1, pp. 47-50.
- Codner, E.C., Caceci, T., Saunders, G.K., Smith, C.A., Robertson, J.L., Martin, R.A. & Troy, G.C. 1992a, "Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection", *Am J Vet Res*, vol. 53, no. 12, pp. 2286-91.
- Codner, E.C. & Maslin, W.R. 1992b, "Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection", *Am J Vet Res*, vol. 53, no. 3, pp. 294-9.

- Codner, E.C., Roberts, R.E. & Ainsworth, A.G. 1985, "Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 186, no. 2, pp. 166-169.
- Coffman, R.L. & von der Weid, T. 1997, "Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses", *The Journal of experimental medicine*, vol. 185, no. 3, pp. 373-375.
- Cohn, L.A. 2003, "Ehrlichiosis and related infections", *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, vol. 33, no. 4, pp. 863-84.
- Cohn, M. 2008, "What roles do regulatory T cells play in the control of the adaptive immune response?", *International immunology*, vol. 20, no. 9, pp. 1107-1118.
- Comazzi, S., Gelain, M.E., Riondato, F. & Paltrinieri, S. 2006, "Flow cytometric expression of common antigens CD18/CD45 in blood from dogs with lymphoid malignancies: a semi-quantitative study", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 112, no. 3-4, pp. 243-52.
- Constant, S.L. & Bottomly, K. 1997, "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches", *Annual Review of Immunology*, vol. 15, pp. 297-322.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E. & Caligiuri, M.A. 2001, "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset", *Blood*, vol. 97, no. 10, pp. 3146-3151.
- Corthay, A. 2009, "How do regulatory T cells work?", *Scandinavian journal of immunology*, vol. 70, no. 4, pp. 326-336.
- Cotman, C.W. & Head, E. 2008, "The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches", *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, vol. 15, no. 4, pp. 685-707.
- Couper, K.N., Blount, D.G. & Riley, E.M. 2008, "IL-10: the master regulator of immunity to infection", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 180, no. 9, pp. 5771-5777.
- Couto, C.G., Lorentzen, L., Beall, M.J., Shields, J., Bertolone, N., Couto, J.I., Couto, K.M., Nash, S., Slack, J., Kvitko, H., Westendorf, N., Marin, L., Iazbik, M.C., Vicario, F.C., Sanz, P. & Ruano, R. 2010, "Serological Study of Selected Vector-Borne Diseases in Shelter Dogs in Central Spain Using Point-of-Care Assays", *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, .
- Cowell, R.L., Tyler, R.D., Clinkenbeard, K.D. & Meinkoth, J.H. 1988, "Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 192, no. 8, pp. 1093-1095.
- D'Agostino, P., Arcoleo, F., Barbera, C., Di Bella, G., La Rosa, M., Misiano, G., Milano, S., Brai, M., Cammarata, G., Feo, S. & Cillari, E. 1998, "Tetracycline inhibits the nitric oxide synthase activity induced by endotoxin in cultured murine macrophages", *Eur J Pharmacol*, vol. 346, no. 2-3, pp. 283-90.
- Daher, K.A., Selsted, M.E. & Lehrer, R.I. 1986, "Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins", *Journal of virology*, vol. 60, no. 3, pp. 1068-1074.
- Dahl, E.L., Shock, J.L., Shenai, B.R., Gut, J., DeRisi, J.L. & Rosenthal, P.J. 2006, "Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 9, pp. 3124-3131.
- Davoust, B., Marie, J.L., Mercier, S., Boni, M., Vandeweghe, A., Parzy, D. & Beugnet, F. 2003, "Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas", *Veterinary parasitology*, vol. 112, no. 1-2, pp. 91-100.
- Davoust, B., Keundjian, A., Rous, V., Maurizi, L. & Parzy, D. 2005, "Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline", *Vet Microbiol*, vol. 107, no. 3-4, pp. 279-83.
- Dawson, J.E., Anderson, B.E., Fishbein, D.B., Sanchez, J.L., Goldsmith, C.S., Wilson, K.H. & Duntley, C.W. 1991, "Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis", *Journal of clinical microbiology*, vol. 29, no. 12, pp. 2741-2745.
- Day, L.E. 1966, "Tetracycline inhibition of cell-free protein synthesis. I. Binding of tetracycline to components of the system", *Journal of Bacteriology*, vol. 91, no. 5, pp. 1917-1923.
- Day, M.J. 2009, "Ageing, Immunosenescence and Inflammageing in the Dog and Cat", *Journal of comparative pathology*, .
- de Lima, V.M., Peiro, J.R. & de Oliveira Vasconcelos, R. 2007, "IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 115, no. 1-2, pp. 189-193.

- de Lima, V.M., Ikeda, F.A., Rossi, C.N., Feitosa, M.M., Vasconcelos, R.O., Nunes, C.M. & Goto, H. 2010, "Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 135, no. 3-4, pp. 296-302.
- Dirscherl, P., Beisker, W., Kremmer, E., Mihalkov, A., Voss, C. & Ziesenis, A. 1995, "Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 48, no. 1-2, pp. 1-10.
- Donatien, A. & Lestoquard, F. 1935, "Existence en Algerie d'une *Rickettsia* du chein", *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, vol. 28, pp. 418-419.
- Duggar, B.M. 1948, "Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 51, no. Art. 2, pp. 177-181.
- Duivenvoorden, W.C., Popovic, S.V., Lhotak, S., Seidlitz, E., Hirte, H.W., Tozer, R.G. & Singh, G. 2002, "Doxycycline decreases tumor burden in a bone metastasis model of human breast cancer", *Cancer research*, vol. 62, no. 6, pp. 1588-1591.
- Dumler, J.S., Asanovich, K.M., Bakken, J.S., Richter, P., Kimsey, R. & Madigan, J.E. 1995a, "Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *Ehrlichia*", *Journal of clinical microbiology*, vol. 33, no. 5, pp. 1098-1103.
- Dumler, J.S. & Bakken, J.S. 1995b, "Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections", *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 20, no. 5, pp. 1102-1110.
- Dumler, J.S., Trigiiani, E.R., Bakken, J.S., Aguero-Rosenfeld, M.E. & Wormser, G.P. 2000, "Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis", *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, vol. 7, no. 1, pp. 6-8.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F.R. 2001, "Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 51, no. Pt 6, pp. 2145-2165.
- Eddlestone, S.M., Neer, T.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R., Gill, A., Hosgood, G., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E.B. 2006, "Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 20, no. 4, pp. 840-844.
- Eddlestone, S.M., Diniz, P.P., Neer, T.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R., Cho, D., Hosgood, G., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E.B. 2007, "Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 21, no. 6, pp. 1237-1242.
- Egeblad, M. & Werb, Z. 2002, "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression", *Nature reviews.Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 161-174.
- Engelberts, I., Moller, A., Schoen, G.J., van der Linden, C.J. & Buurman, W.A. 1991, "Evaluation of measurement of human TNF in plasma by ELISA", *Lymphokine and cytokine research*, vol. 10, no. 1-2, pp. 69-76.
- Estrada-Peña, A. 1995, *Catálogo geográfico de las garrapatas en la Península Ibérica*, Mallinckrodt Veterinary, Pontevedra.
- Estrada-Peña, A. & Reme, C. 2005, "Efficacy of a collar impregnated with amitraz and pyriproxyfen for prevention of experimental tick infestations by *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, and *Ixodes scapularis* in dogs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 226, no. 2, pp. 221-224.
- Everitt, B.S. 1992, *The Analysis of Contingency Tables*, Second edn, Chapman & Hall.
- Faldyna, M., Leva, L., Knotigova, P. & Toman, M. 2001, "Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs-a flow cytometric study", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 82, no. 1-2, pp. 23-37.
- Familian, A., Eikelenboom, P. & Veerhuis, R. 2007, "Minocycline does not affect amyloid beta phagocytosis by human microglial cells", *Neuroscience letters*, vol. 416, no. 1, pp. 87-91.
- Feng, H.M., Popov, V.L. & Walker, D.H. 1994, "Depletion of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in mice with *Rickettsia conorii*-infected endothelium: impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal, overwhelming rickettsial disease", *Infection and immunity*, vol. 62, no. 5, pp. 1952-1960.

- Feng, H.M. & Walker, D.H. 2004, "Mechanisms of immunity to *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 72, no. 2, pp. 966-971.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A. & Munz, C. 2004, "The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 172, no. 3, pp. 1455-1462.
- Ferrán Aranaz, M. 1996, *SPSS para Windows. Programación y análisis estadístico*, McGraw Hill edn, .
- Fiotti, N., Altamura, N., Moretti, M., Wassermann, S., Zacchigna, S., Farra, R., Dapas, B., Consoloni, L., Giacca, M., Grassi, G. & Giansante, C. 2009, "Short term effects of doxycycline on matrix metalloproteinases 2 and 9", *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, vol. 23, no. 2, pp. 153-159.
- Fitzgerald-Bocarsly, P. & Feng, D. 2007, "The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense", *Biochimie*, vol. 89, no. 6-7, pp. 843-855.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., Dai, J. & Singh, S. 2008, "Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history", *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 3-19.
- Font, J., Cairó, J. & Callés, A. 1988, "Ehrlichiosis canina", *Revista de AVEPA*, vol. 8, pp. 141-148.
- Forsgren, A., Schmeling, D. & Quie, P.G. 1974, "Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes", *The Journal of infectious diseases*, vol. 130, no. 4, pp. 412-415.
- Forsgren, A. & Schmeling, D. 1977, "Effect of antibiotics of chemotaxis of human leukocytes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 11, no. 4, pp. 580-584.
- Fouchet, P., Jayat, C., Hechard, Y., Ratinaud, M.H. & Frelat, G. 1993, "Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology", *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, vol. 78, no. 1-2, pp. 95-109.
- Frank, J.R. & Breitschwerdt, E.B. 1999, "A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia", *J Vet Intern Med*, vol. 13, no. 3, pp. 194-201.
- Fraser, I.P., Koziel, H. & Ezekowitz, R.A. 1998, "The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity", *Seminars in immunology*, vol. 10, no. 5, pp. 363-372.
- Friec, G.L. & Kemper, C. 2009, "Complement: coming full circle", *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, .
- Gabler, W.L. & Creamer, H.R. 1991, "Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines", *Journal of periodontal research*, vol. 26, no. 1, pp. 52-58.
- Gamble, J.R., Harlan, J.M., Klebanoff, S.J. & Vadas, M.A. 1985, "Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 24, pp. 8667-8671.
- Ganta, R.R., Wilkerson, M.J., Cheng, C., Rokey, A.M. & Chapes, S.K. 2002, "Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes", *Infect Immun*, vol. 70, no. 1, pp. 380-8.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F. & Lehrer, R.I. 1985, "Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils", *The Journal of clinical investigation*, vol. 76, no. 4, pp. 1427-1435.
- Geigenmuller, U. & Nierhaus, K.H. 1986, "Tetracycline can inhibit tRNA binding to the ribosomal P site as well as to the A site", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 161, no. 3, pp. 723-726.
- Gelain, M.E., Mazzilli, M., Riondato, F., Marconato, L. & Comazzi, S. 2008, "Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 121, no. 3-4, pp. 179-188.
- Gemmell, E. & Seymour, G.J. 1994, "Cytokines and T cell switching", *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, vol. 5, no. 3-4, pp. 249-279.
- Glimcher, L., Shen, F.W. & Cantor, H. 1977, "Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell", *The Journal of experimental medicine*, vol. 145, no. 1, pp. 1-9.

- Gokce, H.I. & Woldehiwet, Z. 1999, "Lymphocyte responses to mitogens and rickettsial antigens in sheep experimentally infected with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*", *Vet Parasitol*, vol. 83, no. 1, pp. 55-64.
- Goldman, E.E., Breitschwerdt, E.B., Grindem, C.B., Hegarty, B.C., Walls, J.J. & Dumler, J.S. 1998, "Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 12, no. 2, pp. 61-70.
- Golub, L.M., Lee, H.M., Lehrer, G., Nemiroff, A., McNamara, T.F., Kaplan, R. & Ramamurthy, N.S. 1983, "Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action", *Journal of periodontal research*, vol. 18, no. 5, pp. 516-526.
- Golub, L.M., McNamara, T.F., D'Angelo, G., Greenwald, R.A. & Ramamurthy, N.S. 1987, "A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity", *Journal of dental research*, vol. 66, no. 8, pp. 1310-1314.
- Golub, L.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T.F., Greenwald, R.A. & Rifkin, B.R. 1991, "Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs", *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, vol. 2, no. 3, pp. 297-321.
- Golub, L.M., McNamara, T.F., Ryan, M.E., Kohut, B., Blieden, T., Payonk, G., Sipos, T. & Baron, H.J. 2001, "Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis", *Journal of clinical periodontology*, vol. 28, no. 2, pp. 146-156.
- Gorham, J.R. & Foreyt, W.J. 2006, "Salmon poisoning disease" in *Infectious diseases of the dog and cat*, ed. C.E. Greene, Third edn, Saunder Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 198-202.
- Grandi, G., Quintavalla, C., Mavropoulou, A., Genchi, M., Gnudi, G., Bertoni, G. & Kramer, L. 2010, "A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*)", *Veterinary parasitology*, vol. 169, no. 3-4, pp. 347-351.
- Greeley, E.H., Kealy, R.D., Ballam, J.M., Lawler, D.F. & Segre, M. 1996, "The influence of age on the canine immune system", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 55, no. 1-3, pp. 1-10.
- Greeley, E.H., Ballam, J.M., Harrison, J.M., Kealy, R.D., Lawler, D.F. & Segre, M. 2001, "The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador Retriever dogs", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 82, no. 1-2, pp. 57-71.
- Greene, R.T. 1995, "Canine ehrlichiosis: clinical implications for humoral factors" in *Kirk's Current Veterinary Theraphy XII, Small Animal Practice*, eds. J.D. Bonagura & R.W. Kirk, WB Saunders, Philadelphia, pp. 290-293.
- Greene, C.E. & Breitschwerdt, E.B. 2006, "Rocky Mountain Spotted Fever. Rocky Mountain Spotted Fever, Murine Typhuslike Disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q Fever." in *Infectious Diseases of the dog and cat*, ed. C.E. Greene, Third edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 232-245.
- Greig, B. & Armstrong, P.J. 2006a, "Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection)" in *Infectious diseases of the dog and cat*, ed. C.E. Greene, Third edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 203-232.
- Greig, B., Breitschwerdt, E.B. & Armstrong, P.J. 2006b, "Canine granulocytotropic ehrlichiosis (*E. ewingii* infection). Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia infection" in *Infectious diseases of the dog and cat*, ed. C.E. Greene, Third edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 203-232.
- Grenier, D., Plamondon, P., Sorsa, T., Lee, H.M., McNamara, T., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M., Teronen, O. & Mayrand, D. 2002, "Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives", *Journal of periodontology*, vol. 73, no. 1, pp. 79-85.
- Griffin, M.O., Fricovsky, E., Ceballos, G. & Villarreal, F.J. 2010, "Tetracyclines: A pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature", *American journal of physiology. Cell physiology*, .
- Grindem, C.B., Breitschwerdt, E.B., Perkins, P.C., Cullins, L.D., Thomas, T.J. & Hegarty, B.C. 1999, "Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis", *Journal of the American Animal Hospital Association*, vol. 35, no. 1, pp. 56-61.
- Grone, A., Frisk, A.L. & Baumgartner, W. 1998, "Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 65, no. 1, pp. 11-27.

- Groves, M.G., Dennis, G.L., Amyx, H.L. & Huxsoll, D.L. 1975, "Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*)", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 36, no. 7, pp. 937-940.
- Gucker, F.T., Jr & O'Konski, C.T. 1947, "A photoelectronic counter for colloidal particles", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 69, no. 10, pp. 2422-2431.
- Hamilton-Miller, J.M. 2001, "Immunopharmacology of antibiotics: direct and indirect immunomodulation of defence mechanisms", *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, vol. 13, no. 2, pp. 107-111.
- Hanemaaijer, R., Sorsa, T., Kontinen, Y.T., Ding, Y., Sutinen, M., Visser, H., van Hinsbergh, V.W., Helaakoski, T., Kainulainen, T., Ronka, H., Tschesche, H. & Salo, T. 1997, "Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 50, pp. 31504-31509.
- Harrus, S., Waner, T., Avidar, Y., Bogin, E., Peh, H. & Bark, H. 1996a, "Serum protein alterations in canine ehrlichiosis", *Veterinary parasitology*, vol. 66, no. 3-4, pp. 241-249.
- Harrus, S., Waner, T., Weiss, D.J., Keysary, A. & Bark, H. 1996b, "Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 51, no. 1-2, pp. 13-20.
- Harrus, S., Aroch, I., Lavy, E. & Bark, H. 1997a, "Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia", *The Veterinary record*, vol. 141, no. 10, pp. 247-250.
- Harrus, S., Kass, P.H., Klement, E. & Waner, T. 1997b, "Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease", *Vet Rec*, vol. 141, no. 14, pp. 360-3.
- Harrus, S., Ofri, R., Aizenberg, I. & Waner, T. 1998a, "Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection", *Veterinary parasitology*, vol. 78, no. 2, pp. 155-160.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I. & Bark, H. 1998b, "Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course", *J Clin Microbiol*, vol. 36, no. 7, pp. 2140-2.
- Harrus, S., Waner, T., Keysary, A., Aroch, I., Voet, H. & Bark, H. 1998c, "Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 62, no. 1, pp. 15-27.
- Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F. & Cornelissen, A.W. 1999, "Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis", *J Clin Microbiol*, vol. 37, no. 9, pp. 2745-9.
- Harrus, S., Day, M.J., Waner, T. & Bark, H. 2001, "Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*", *Vet Microbiol*, vol. 83, no. 4, pp. 343-9.
- Harrus, S., Waner, T., Friedmann-Morvinski, D., Fishman, Z., Bark, H. & Harmelin, A. 2003, "Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 96, no. 3-4, pp. 239-43.
- Harrus, S. & Waner, T. 2010, "Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview", *Veterinary journal (London, England : 1997)*, .
- Harvey, J.W. 2006, "Thrombocytotropic anaplasmosis (*A. platys* (*E. platys*) infection). Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and *Wolbachia* Infection." in *Infectious Diseases of the dog and cat*, ed. C.E. Greene, Third edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 203-232.
- Harvey, J.W., Simpson, C.F. & Gaskin, J.M. 1978, "Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs", *The Journal of infectious diseases*, vol. 137, no. 2, pp. 182-188.
- Hash, J.H., Wishnick, M. & Miller, P.A. 1964, "On the Mode of Action of the Tetracycline Antibiotics in *Staphylococcus aureus*", *The Journal of biological chemistry*, vol. 239, pp. 2070-2078.
- Heeb, H.L., Wilkerson, M.J., Chun, R. & Ganta, R.R. 2003, "Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog", *J Am Anim Hosp Assoc*, vol. 39, no. 4, pp. 379-84.
- Helle, M., Boeije, L., de Groot, E., de Vos, A. & Aarden, L. 1991, "Sensitive ELISA for interleukin-6. Detection of IL-6 in biological fluids: synovial fluids and sera", *Journal of immunological methods*, vol. 138, no. 1, pp. 47-56.

- Herrera, G., Diaz, L., Martinez-Romero, A., Gomes, A., Villamon, E., Callaghan, R.C. & O'Connor, J.E. 2007, "Cytoomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research", *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, vol. 21, no. 2, pp. 176-182.
- Hess, P.R., English, R.V., Hegarty, B.C., Brown, G.D. & Breitschwerdt, E.B. 2006, "Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 109, no. 1-2, pp. 117-25.
- Hibler, S.C., Hoskins, J.D. & Greene, C.E. 1986, "Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia", *Compendium Continuing Education Practice Veterinary*, vol. 8, pp. 106-114.
- Hinrichsen, V.L., Whitworth, U.G., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. & Mather, T.N. 2001, "Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 218, no. 7, pp. 1092-1097.
- HogenEsch, H., Thompson, S., Dunham, A., Ceddia, M. & Hayek, M. 2004, "Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 97, no. 1-2, pp. 77-85.
- Hogenesch, H. & Thompson, S. 2009, "Effect of Ageing on the Immune Response of Dogs to Vaccines", *Journal of comparative pathology*, .
- Horiuchi, Y., Hanazawa, A., Nakajima, Y., Nariai, Y., Asanuma, H., Kuwabara, M., Yukawa, M. & Ito, H. 2007a, "T-helper (Th)1/Th2 imbalance in the peripheral blood of dogs with malignant tumor", *Microbiology and immunology*, vol. 51, no. 11, pp. 1135-1138.
- Horiuchi, Y., Nakajima, Y., Nariai, Y., Asanuma, H., Kuwabara, M. & Yukawa, M. 2007b, "Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes--a flow cytometric study", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 118, no. 3-4, pp. 179-185.
- Hotopp, J.C., Lin, M., Madupu, R., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Eisen, J.A., Seshadri, R., Ren, Q., Wu, M., Utterback, T.R., Smith, S., Lewis, M., Khouri, H., Zhang, C., Niu, H., Lin, Q., Ohashi, N., Zhi, N., Nelson, W., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Rosovitz, M.J., Sundaram, J., Daugherty, S.C., Davidsen, T., Durkin, A.S., Gwinn, M., Haft, D.H., Selengut, J.D., Sullivan, S.A., Zafar, N., Zhou, L., Benahmed, F., Forberger, H., Halpin, R., Mulligan, S., Robinson, J., White, O., Rikihisa, Y. & Tettelin, H. 2006, "Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents", *PLoS genetics*, vol. 2, no. 2, pp. e21.
- Huang, H., Lin, M., Wang, X., Kikuchi, T., Mottaz, H., Norbeck, A. & Rikihisa, Y. 2008, "Proteomic analysis of and immune responses to *Ehrlichia chaffeensis* lipoproteins", *Infection and immunity*, vol. 76, no. 8, pp. 3405-3414.
- Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M., Ferguson, J.A. & Walker, J.S. 1969, "*Ehrlichia canis*--the causative agent of a haemorrhagic disease of dogs?", *The Veterinary record*, vol. 85, no. 21, pp. 587.
- Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M., Amyx, H.L. & Ferguson, J.A. 1970, "Epizootiology of tropical canine pancytopenia", *Journal of wildlife diseases*, vol. 6, no. 4, pp. 220-225.
- Ihtiyar, E., Fatih Yasar, N., Erkasap, N., Koken, T., Tosun, M., Oner, S. & Erkasap, S. 2009, "Effects of Doxycycline on Renal Ischemia Reperfusion Injury Induced by Abdominal Compartment Syndrome", *The Journal of surgical research*, .
- Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W. & Rikihisa, Y. 1994a, "Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis", *J Clin Microbiol*, vol. 32, no. 7, pp. 1658-62.
- Iqbal, Z. & Rikihisa, Y. 1994b, "Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment", *J Clin Microbiol*, vol. 32, no. 7, pp. 1644-9.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J. 1957, "Virus interference. I. The interferon", *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, vol. 147, no. 927, pp. 258-267.
- Ismail, N., Soong, L., McBride, J.W., Valbuena, G., Olano, J.P., Feng, H.M. & Walker, D.H. 2004, "Overproduction of TNF-alpha by CD8+ type 1 cells and down-regulation of IFN-gamma production by CD4+ Th1 cells contribute to toxic shock-like syndrome in an animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 172, no. 3, pp. 1786-1800.
- Ismail, N., Stevenson, H.L. & Walker, D.H. 2006, "Role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin-10 in the pathogenesis of severe murine monocytotropic ehrlichiosis: increased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to fatal ehrlichial infection", *Infect Immun*, vol. 74, no. 3, pp. 1846-56.

- Ismail, N., Crossley, E.C., Stevenson, H.L. & Walker, D.H. 2007, "Relative importance of T-cell subsets in monocytotropic ehrlichiosis: a novel effector mechanism involved in *Ehrlichia*-induced immunopathology in murine ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 75, no. 9, pp. 4608-4620.
- Janeway, C.A., Jr 1989, "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology", *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 54 Pt 1, pp. 1-13.
- Janeway, C.A., Jr 1992, "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self", *Immunology today*, vol. 13, no. 1, pp. 11-16.
- Janeway, C.A., Jr & Medzhitov, R. 1998, "Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response", *Seminars in immunology*, vol. 10, no. 5, pp. 349-350.
- Janeway, C.A., Jr & Medzhitov, R. 2002, "Innate immune recognition", *Annual Review of Immunology*, vol. 20, pp. 197-216.
- Jimenez-Valera, M., Moreno, E. & Ruiz-Bravo, A. 1997, "Immunomodulation by antimicrobial agents", *Recent Research Developments in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 2, pp. 83-94.
- Johnson, E.M., Ewing, S.A., Barker, R.W., Fox, J.C., Crow, D.W. & Kocan, K.M. 1998, "Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae)", *Veterinary parasitology*, vol. 74, no. 2-4, pp. 277-288.
- Jonuleit, H. & Schmitt, E. 2003, "The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 171, no. 12, pp. 6323-6327.
- Kakoma, I., Carson, C.A., Ristic, M., Stephenson, E.M., Hildebrandt, P.K. & Huxsoll, D.L. 1978, "Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 20, no. 1, pp. 242-247.
- Kakoma, I., Hansen, R.D., Anderson, B.E., Hanley, T.A., Sims, K.G., Liu, L., Bellamy, C., Long, M.T. & Baek, B.K. 1994, "Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis", *Journal of clinical microbiology*, vol. 32, no. 1, pp. 170-175.
- Kanabrocki, E.L., Sothorn, R.B., Messmore, H.L., Roitman-Johnson, B., McCormick, J.B., Dawson, S., Bremner, F.W., Third, J.L., Nemchausky, B.A., Shirazi, P. & Scheving, L.E. 1999, "Circadian interrelationships among levels of plasma fibrinogen, blood platelets, and serum interleukin-6", *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, vol. 5, no. 1, pp. 37-42.
- Kaylor, P.S., Crawford, T.B., McElwain, T.F. & Palmer, G.H. 1991, "Passive transfer of antibody to *Ehrlichia risticii* protects mice from ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 59, no. 6, pp. 2058-2062.
- Keppel, K.E., Campbell, K.L., Zuckermann, F.A., Greeley, E.A., Schaeffer, D.J. & Husmann, R.J. 2008, "Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 123, no. 3-4, pp. 337-344.
- Kidd, P. 2003, "Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease", *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, vol. 8, no. 3, pp. 223-246.
- Kimbrell, D.A. & Beutler, B. 2001, "The evolution and genetics of innate immunity", *Nature reviews.Genetics*, vol. 2, no. 4, pp. 256-267.
- Kjelgaard-Hansen, M., Luntang-Jensen, M., Willesen, J. & Jensen, A.L. 2007, "Measurement of serum interleukin-10 in the dog", *Veterinary journal (London, England : 1997)*, vol. 173, no. 2, pp. 361-365.
- Kloppenborg, M., Dijkmans, B.A. & Breedveld, F.C. 1995a, "Antimicrobial therapy for rheumatoid arthritis", *Bailliere's Clinical Rheumatology*, vol. 9, no. 4, pp. 759-769.
- Kloppenborg, M., Verweij, C.L., Miltenburg, A.M., Verhoeven, A.J., Daha, M.R., Dijkmans, B.A. & Breedveld, F.C. 1995b, "The influence of tetracyclines on T cell activation", *Clinical and experimental immunology*, vol. 102, no. 3, pp. 635-641.
- Kloppenborg, M., Brinkman, B.M., de Rooij-Dijk, H.H., Miltenburg, A.M., Daha, M.R., Breedveld, F.C., Dijkmans, B.A. & Verweij, C. 1996, "The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, no. 4, pp. 934-940.

- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B. & Trinchieri, G. 1989, "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes", *The Journal of experimental medicine*, vol. 170, no. 3, pp. 827-845.
- Kordick, S.K., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., Bradley, J.M., Rumbough, R., McPherson, J.T. & MacCormack, J.N. 1999, "Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina", *J Clin Microbiol*, vol. 37, no. 8, pp. 2631-8.
- Kozel, T.R., MacGill, R.S., Percival, A. & Zhou, Q. 2004, "Biological activities of naturally occurring antibodies reactive with *Candida albicans* mannan", *Infection and immunity*, vol. 72, no. 1, pp. 209-218.
- Krensky, A.M., Vincenti, F. & Bennett, W.M. 2007, "Inmunosupresores, tolerógenos e inmunoestimulantes" in *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, eds. L.L. Brunton, J.S. Lazo & K.L. Parker, Undécima edn, Mc Graw Hill, Mexico D.F., pp. 1405-1431.
- Kucuk, A., Kabadere, S., Tosun, M., Koken, T., Kinaci, M.K., Isikli, B. & Erkasap, N. 2009, "Protective effects of doxycycline in ischemia/reperfusion injury on kidney", *Journal of physiology and biochemistry*, vol. 65, no. 2, pp. 183-191.
- Kunzendorf, U., Tran, T.H. & Bulfone-Paus, S. 1998, "The Th1-Th2 paradigm in 1998: law of nature or rule with exceptions", *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 13, no. 10, pp. 2445-2448.
- Kuzin, I.I., Snyder, J.E., Ugine, G.D., Wu, D., Lee, S., Bushnell, T., Jr, Insel, R.A., Young, F.M. & Bottaro, A. 2001, "Tetracyclines inhibit activated B cell function", *International immunology*, vol. 13, no. 7, pp. 921-931.
- Kwok, S. & Higuchi, R. 1989, "Avoiding false positives with PCR", *Nature*, vol. 339, no. 6221, pp. 237-238.
- Lachaud, L., Marchegui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P. & Bastien, P. 2002, "Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis", *J Clin Microbiol*, vol. 40, no. 1, pp. 210-5.
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. & Phillips, J.H. 1986, "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 136, no. 12, pp. 4480-4486.
- Larsen, H.J., Overnes, G., Waldeland, H. & Johansen, G.M. 1994, "Immunosuppression in sheep experimentally infected with *Ehrlichia phagocytophila*", *Research in veterinary science*, vol. 56, no. 2, pp. 216-224.
- Lawler, D.F., Larson, B.T., Ballam, J.M., Smith, G.K., Biery, D.N., Evans, R.H., Greeley, E.H., Segre, M., Stowe, H.D. & Kealy, R.D. 2008, "Diet restriction and ageing in the dog: major observations over two decades", *The British journal of nutrition*, vol. 99, no. 4, pp. 793-805.
- le Fichoux, Y., Quaranta, J.F., Aueuvre, J.P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., Rousseau, D. & Kubar, J. 1999, "Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France", *Journal of clinical microbiology*, vol. 37, no. 6, pp. 1953-1957.
- Lee, E.H. & Rikihisa, Y. 1996, "Absence of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 (IL-6), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression but presence of IL-1beta, IL-8, and IL-10 expression in human monocytes exposed to viable or killed *Ehrlichia chaffeensis*", *Infection and immunity*, vol. 64, no. 10, pp. 4211-4219.
- Lee, E.H. & Rikihisa, Y. 1997, "Anti-*Ehrlichia chaffeensis* antibody complexed with *E. chaffeensis* induces potent proinflammatory cytokine mRNA expression in human monocytes through sustained reduction of IkappaB-alpha and activation of NF-kappaB", *Infection and immunity*, vol. 65, no. 7, pp. 2890-2897.
- Lee, H.M., Golub, L.M., Cao, J., Teronen, O., Laitinen, M., Salo, T., Zucker, S. & Sorsa, T. 2001, "CMT-3, a non-antimicrobial tetracycline (TC), inhibits MT1-MMP activity: relevance to cancer", *Current medicinal chemistry*, vol. 8, no. 3, pp. 257-260.
- Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S., Ganz, T. & Selsted, M.E. 1989, "Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity", *The Journal of clinical investigation*, vol. 84, no. 2, pp. 553-561.
- Lepidi, H., Bunnell, J.E., Martin, M.E., Madigan, J.E., Stuen, S. & Dumler, J.S. 2000, "Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 62, no. 1, pp. 29-37.

- Lewis, G.E., Jr, Ristic, M., Smith, R.D., Lincoln, T. & Stephenson, E.H. 1977, "The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 38, no. 12, pp. 1953-1955.
- Lin, M. & Rikihisa, Y. 2003, "*Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival", *Infect Immun*, vol. 71, no. 9, pp. 5324-31.
- Lin, M. & Rikihisa, Y. 2004, "*Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-kappa B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes", *Cell Microbiol*, vol. 6, no. 2, pp. 175-86.
- Lindeman, J.H., Abdul-Hussien, H., van Bockel, J.H., Wolterbeek, R. & Kleemann, R. 2009, "Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells", *Circulation*, vol. 119, no. 16, pp. 2209-2216.
- Liu, J., Kuszynski, C.A. & Baxter, B.T. 1999, "Doxycycline induces Fas/Fas ligand-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes", *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 260, no. 2, pp. 562-7.
- Lorente, C., Sainz, A. & Tesouro, M.A. 2008, "Immunophenotype of dogs with subclinical ehrlichiosis", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1149, pp. 114-117.
- Lunemann, A., Lunemann, J.D. & Munz, C. 2009, "Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity", *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, vol. 15, no. 9-10, pp. 352-358.
- MacNamara, K.C., Racine, R., Chatterjee, M., Borjesson, D. & Winslow, G.M. 2009, "Diminished hematopoietic activity associated with alterations in innate and adaptive immunity in a mouse model of human monocytic ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 77, no. 9, pp. 4061-4069.
- Maddur, M.S., Kaveri, S.V. & Bayry, J. 2010, "Basophils as antigen presenting cells", *Trends in immunology*, vol. 31, no. 2, pp. 45-48.
- Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R.C., Ristic, M., Cox, D. & McDade, J.E. 1987, "Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia", *The New England journal of medicine*, vol. 316, no. 14, pp. 853-856.
- Manna, L., Reale, S., Picillo, E., Vitale, F. & Gravino, A.E. 2008, "Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol", *Cytokine*, vol. 44, no. 2, pp. 288-292.
- Martin, M.E., Caspersen, K. & Dumler, J.S. 2001, "Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon-gamma and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis", *The American journal of pathology*, vol. 158, no. 5, pp. 1881-1888.
- Masmoudi, A., Dammak, A., Chaaben, H., Maalej, N., Akrouf, F. & Turki, H. 2008, "Doxycycline for the treatment of cutaneous leishmaniasis", *Dermatology online journal*, vol. 14, no. 8, pp. 22.
- Matthewman, L.A., Kelly, P.J., Brouqui, P. & Raoult, D. 1994, "Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection", *Journal of the South African Veterinary Association*, vol. 65, no. 3, pp. 104-107.
- Mavromatis, K., Doyle, C.K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M.P., Chain, P., Shin, M., Malfatti, S., Larimer, F., Copeland, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Yu, X.J., Walker, D.H., McBride, J.W. & Kyrpides, N.C. 2006, "The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies", *J Bacteriol*, vol. 188, no. 11, pp. 4015-23.
- McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Boudreaux, C., Guedry, T. & Walker, D.H. 2003, "Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins", *Infection and immunity*, vol. 71, no. 5, pp. 2516-2524.
- McDonough, S.P. & Moore, P.F. 2000, "Clinical, hematologic, and immunophenotypic characterization of canine large granular lymphocytosis", *Veterinary pathology*, vol. 37, no. 6, pp. 637-646.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr 1997a, "Innate immunity: impact on the adaptive immune response", *Current opinion in immunology*, vol. 9, no. 1, pp. 4-9.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr 1997b, "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition", *Cell*, vol. 91, no. 3, pp. 295-298.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr 1998, "Innate immune recognition and control of adaptive immune responses", *Seminars in immunology*, vol. 10, no. 5, pp. 351-353.

- Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr 2000, "Innate immunity", *The New England journal of medicine*, vol. 343, no. 5, pp. 338-344.
- Mege, J.L., Meghari, S., Honstetter, A., Capo, C. & Raoult, D. 2006, "The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases", *The Lancet infectious diseases*, vol. 6, no. 9, pp. 557-569.
- Messick, J.B. & Rikihisa, Y. 1993, "Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization, and proliferation in host cells by flow cytometry", *Infection and immunity*, vol. 61, no. 9, pp. 3803-3810.
- Messick, J.B. & Rikihisa, Y. 1994, "Inhibition of binding, entry, or intracellular proliferation of *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells by anti-*E. risticii* serum, immunoglobulin G, or Fab fragment", *Infect Immun*, vol. 62, no. 8, pp. 3156-61.
- Milano, S., Arcoleo, F., D'Agostino, P. & Cillari, E. 1997, "Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 1, pp. 117-121.
- Ming, W.J., Bersani, L. & Mantovani, A. 1987, "Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 138, no. 5, pp. 1469-1474.
- Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., Caballero, M.J. & Molina, R. 2007, "A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006)", *Parasitol Res.* ,
- Mitre, E., Taylor, R.T., Kubofcik, J. & Nutman, T.B. 2004, "Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 172, no. 4, pp. 2439-2445.
- Mohamed, A., Matsumoto, Y., Yoshihara, K., Matsumoto, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., Onodera, T. & Hirota, Y. 1997, "Establishment of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay for canine interleukin-8", *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, vol. 59, no. 1, pp. 39-41.
- Monaco, J.J. 1995, "Pathways for the processing and presentation of antigens to T cells", *Journal of leukocyte biology*, vol. 57, no. 4, pp. 543-547.
- Moshkovskii, S.D. 1945, "Cytotropic inducers of infection and the classification of the Rickettsiae with Clamydozoa", *Adv. Mod. Biol. (Moscow)*, vol. 19, pp. 1-44.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. 1986, "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 136, no. 7, pp. 2348-2357.
- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L. 1989, "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties", *Annual Review of Immunology*, vol. 7, pp. 145-173.
- Mosmann, T.R. & Sad, S. 1996, "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more", *Immunology today*, vol. 17, no. 3, pp. 138-146.
- Mott, J., Barnewell, R.E. & Rikihisa, Y. 1999, "Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells", *Infection and immunity*, vol. 67, no. 3, pp. 1368-1378.
- Mott, J. & Rikihisa, Y. 2000, "Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils", *Infection and immunity*, vol. 68, no. 12, pp. 6697-6703.
- Muñoz, J. & Geister, R. 1950, "Inhibition of phagocytosis by aureomycin", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, vol. 75, no. 2, pp. 367-370.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L.S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T. & Fytianou, A. 2003, "Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods", *Vet Microbiol*, vol. 91, no. 2-3, pp. 197-204.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D., Leontides, L.S. & Kontos, V.S. 2004, "Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases", *J Am Anim Hosp Assoc*, vol. 40, no. 3, pp. 174-84.
- Nandi, B., Chatterjee, M., Hogle, K., McLaughlin, M., MacNamara, K., Racine, R. & Winslow, G.M. 2009, "Antigen display, T-cell activation, and immune evasion during acute and chronic ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 77, no. 10, pp. 4643-4653.

- Navikas, V., Link, J., Wahren, B., Persson, C. & Link, H. 1994, "Increased levels of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-4 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA expressing blood mononuclear cells in human HIV infection", *Clinical and experimental immunology*, vol. 96, no. 1, pp. 59-63.
- Navikas, V., Link, J., Persson, C., Olsson, T., Hojeberg, B., Ljungdahl, A., Link, H. & Wahren, B. 1995, "Increased mRNA expression of IL-6, IL-10, TNF-alpha, and perforin in blood mononuclear cells in human HIV infection", *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*, vol. 9, no. 5, pp. 484-489.
- Neer, T.M., Eddlestone, S.M., Gaunt, S.D. & Corstvet, R.E. 1999, "Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 501-504.
- Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T. & Lappin, M.R. 2002, "Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine", *J Vet Intern Med*, vol. 16, no. 3, pp. 309-15.
- Neer, T.M. & Harrus, S. 2006, "Canine Monocytotropic Ehrlichiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, and *N. risticii* Infections). Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and *Wolbachia* Infection." in *Infectious Diseases of the dog and cat*, ed. C.E. Greene, Third edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 203-217.
- Netea, M.G., Drenth, J.P., De Bont, N., Hijmans, A., Keuter, M., Dharmana, E., Demacker, P.N. & van der Meer, J.W. 1996, "A semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method for measurement of MRNA for TNF-alpha and IL-1 beta in whole blood cultures: its application in typhoid fever and exentric exercise", *Cytokine*, vol. 8, no. 9, pp. 739-744.
- Newton, C.R. 1995, "Setting up a PCR laboratory" in *PCR: Essential data*, ed. C.R. Newton, Wiley, New York, USA, pp. 216.
- Nganvongpanit, K., Pothacharoen, P., Suwankong, N., Ong-Chai, S. & Kongtawelert, P. 2009, "The effect of doxycycline on canine hip osteoarthritis: design of a 6-months clinical trial", *Journal of veterinary science*, vol. 10, no. 3, pp. 239-247.
- Nicod, L.P. 1993, "Cytokines. 1. Overview", *Thorax*, vol. 48, no. 6, pp. 660-667.
- Nielsen, C.H. & Leslie, R.G. 2002, "Complement's participation in acquired immunity", *Journal of leukocyte biology*, vol. 72, no. 2, pp. 249-261.
- Nikodemova, M., Watters, J.J., Jackson, S.J., Yang, S.K. & Duncan, I.D. 2007, "Minocycline down-regulates MHC II expression in microglia and macrophages through inhibition of IRF-1 and protein kinase C (PKC)alpha/betaII", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 20, pp. 15208-15216.
- Nyindo, M.B., Ristic, M., Huxsoll, D.L. & Smith, A.R. 1971, "Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent--*Ehrlichia canis*", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 32, no. 11, pp. 1651-1658.
- Nyindo, M., Huxsoll, D.L., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J.L., Carson, C.A. & Stephenson, E.H. 1980, "Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 41, no. 2, pp. 250-254.
- O'Connor, J.E., Callaghan, R.C., Escudero, M., Herrera, G., Martinez, A., Monteiro, M.D. & Montoliu, H. 2001, "The relevance of flow cytometry for biochemical analysis", *IUBMB life*, vol. 51, no. 4, pp. 231-239.
- O'Connor, T.P., Hanscom, J.L., Hegarty, B.C., Groat, R.G. & Breitschwerdt, E.B. 2006, "Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 67, no. 2, pp. 206-210.
- O'Dell, J.R., Paulsen, G., Haire, C.E., Blakely, K., Palmer, W., Wees, S., Eckhoff, P.J., Klassen, L.W., Churchill, M., Doud, D., Weaver, A. & Moore, G.F. 1999, "Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis with minocycline: four-year followup of a double-blind, placebo-controlled trial", *Arthritis and Rheumatism*, vol. 42, no. 8, pp. 1691-1695.
- Okada, H., Usuda, H., Tajima, T., Kawahara, M., Yoshino, T. & Rikihisa, Y. 2003, "Distribution of ehrlichiae in tissues as determined by in-situ hybridization", *Journal of comparative pathology*, vol. 128, no. 2-3, pp. 182-187.
- Oppenheim, J.J., Biragyn, A., Kwak, L.W. & Yang, D. 2003, "Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 62 Suppl 2, pp. ii17-21.

- Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., de Caprariis, D., Parisi, A., Capelli, G. & Stanneck, D. 2008, "Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions", *Veterinary parasitology*, vol. 153, no. 3-4, pp. 320-328.
- Otranto, D., de Caprariis, D., Lia, R.P., Tarallo, V., Lorusso, V., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, S., Diniz, P.P., Mencke, N., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E., Capelli, G. & Stanneck, D. 2010, "Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study", *Veterinary parasitology*, vol. 172, no. 3-4, pp. 323-332.
- Owens, M.A., Vall, H.G., Hurley, A.A. & Wormsley, S.B. 2000, "Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry", *J Immunol Methods*, vol. 243, no. 1-2, pp. 33-50.
- Park, J. & Rikihisa, Y. 1991, "Inhibition of *Ehrlichia risticii* infection in murine peritoneal macrophages by gamma interferon, a calcium ionophore, and concanavalin A", *Infection and immunity*, vol. 59, no. 10, pp. 3418-3423.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. & Dong, C. 2005, "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17", *Nature immunology*, vol. 6, no. 11, pp. 1133-1141.
- Pasquale, T.R. & Tan, J.S. 2005, "Nonantimicrobial effects of antibacterial agents", *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 40, no. 1, pp. 127-135.
- Patel, R.N., Attur, M.G., Dave, M.N., Patel, I.V., Stuchin, S.A., Abramson, S.B. & Amin, A.R. 1999, "A novel mechanism of action of chemically modified tetracyclines: inhibition of COX-2-mediated prostaglandin E2 production", *J Immunol*, vol. 163, no. 6, pp. 3459-67.
- Perez, M., Rikihisa, Y. & Wen, B. 1996, "*Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization", *J Clin Microbiol*, vol. 34, no. 9, pp. 2133-9.
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q. & Rikihisa, Y. 2006, "Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1078, pp. 110-117.
- Perry, A.K., Chen, G., Zheng, D., Tang, H. & Cheng, G. 2005, "The host type I interferon response to viral and bacterial infections", *Cell research*, vol. 15, no. 6, pp. 407-422.
- Philip, C.B., Hadlow, W.J. & Hughes, L.E. 1954, "Studies on salmon poisoning disease of canines. I. The rickettsial relationships and pathogenicity of *Neorickettsia helmintheca*", *Experimental parasitology*, vol. 3, no. 4, pp. 336-350.
- Philip, R. & Epstein, L.B. 1986, "Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1", *Nature*, vol. 323, no. 6083, pp. 86-89.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G. & Ruitenbergh, J. 1994, "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*", *Infection and immunity*, vol. 62, no. 1, pp. 229-235.
- Pinelli, E., Gonzalo, R.M., Boog, C.J., Rutten, V.P., Gebhard, D., del Real, G. & Ruitenbergh, E.J. 1995, "*Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner", *European journal of immunology*, vol. 25, no. 6, pp. 1594-1600.
- Pinelli, E., van der Kaaij, S.Y., Slappendel, R., Fragio, C., Ruitenbergh, E.J., Bernadina, W. & Rutten, V.P. 1999, "Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 69, no. 2-4, pp. 121-126.
- Powell, R.J. & Jenkins, J.S. 1987, "Lymphocyte subpopulations", *Postgraduate medical journal*, vol. 63, no. 745, pp. 931-935.
- Price, J.E. & Dolan, T.T. 1980, "A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis", *The Veterinary record*, vol. 107, no. 12, pp. 275-277.
- Quaranta, A., Siniscalchi, M., Frate, A., Iacoviello, R., Buonavoglia, C. & Vallortigara, G. 2006, "Lateralised behaviour and immune response in dogs: relations between paw preference and interferon-gamma, interleukin-10 and IgG antibodies production", *Behavioural brain research*, vol. 166, no. 2, pp. 236-240.
- Raff, M.C. 1971, "T and B lymphocytes in mice studied by using antisera against surface antigenic markers", *The American journal of pathology*, vol. 65, no. 2, pp. 467-478.

- Ramamurthy, N.S., Kucine, A.J., McClain, S.A., McNamara, T.F. & Golub, L.M. 1998a, "Topically applied CMT-2 enhances wound healing in streptozotocin diabetic rat skin", *Advances in Dental Research*, vol. 12, no. 2, pp. 144-148.
- Ramamurthy, N.S., Schroeder, K.L., McNamara, T.F., Gwinnett, A.J., Evans, R.T., Bosko, C. & Golub, L.M. 1998b, "Root-surface caries in rats and humans: inhibition by a non-antimicrobial property of tetracyclines", *Advances in Dental Research*, vol. 12, no. 2, pp. 43-50.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Flower, R.J. 2008a, "Antibióticos" in *Farmacología*, eds. H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter & R.J. Flower, Sexta edn, Elsevier, Barcelona, España, pp. 661-678.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Flower, R.J. 2008b, "Antiinflamatorios e inmunodepresores" in *Farmacología*, eds. H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter & R.J. Flower, Sexta edn, Elsevier, Barcelona, España, pp. 226-247.
- Reardon, M.J. & Pierce, K.R. 1981a, "Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems", *Veterinary pathology*, vol. 18, no. 1, pp. 48-61.
- Reardon, M.J. & Pierce, K.R. 1981b, "Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs", *Veterinary pathology*, vol. 18, no. 3, pp. 384-395.
- Reddy, G.R. & Streck, C.P. 1999, "Variability in the 28-kDa surface antigen protein multigene locus of isolates of the emerging disease agent *Ehrlichia chaffeensis* suggests that it plays a role in immune evasion", *Molecular cell biology research communications : MCBRC*, vol. 1, no. 3, pp. 167-175.
- Reis, A.B., Carneiro, C.M., Carvalho, M.G., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Genaro, O., Correa-Oliveira, R. & Martins-Filho, O.A. 2005, "Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 103, no. 3-4, pp. 173-185.
- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Guerra, L.L., Carvalho, M.G., Mayrink, W., Genaro, O., Correa-Oliveira, R. & Martins-Filho, O.A. 2006, "Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*", *Clinical and experimental immunology*, vol. 146, no. 2, pp. 303-311.
- Rikihisa, Y., Perry, B.D. & Cordes, D.O. 1985, "Ultrastructural study of ehrlichial organisms in the large colons of ponies infected with Potomac horse fever", *Infection and immunity*, vol. 49, no. 3, pp. 505-512.
- Rikihisa, Y., Johnson, G.C. & Burger, C.J. 1987, "Reduced immune responsiveness and lymphoid depletion in mice infected with *Ehrlichia risticii*", *Infection and immunity*, vol. 55, no. 9, pp. 2215-2222.
- Rikihisa, Y. 1991, "The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases", *Clinical microbiology reviews*, vol. 4, no. 3, pp. 286-308.
- Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Fox, J.C., Siregar, A.G., Pasaribu, F.H. & Malole, M.B. 1992, "Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection", *Journal of clinical microbiology*, vol. 30, no. 1, pp. 143-148.
- Rikihisa, Y., Ewing, S.A. & Fox, J.C. 1994, "Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans", *J Clin Microbiol*, vol. 32, no. 9, pp. 2107-12.
- Rikihisa, Y. 1999, "Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis*", *Microbes Infect*, vol. 1, no. 5, pp. 367-76.
- Rikihisa, Y. 2010, "Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*", *Veterinary parasitology*, vol. 167, no. 2-4, pp. 155-166.
- Ristic, M., Huxsoll, D.L., Weisiger, R.M., Hildebrandt, P.K. & Nyindo, M.B. 1972, "Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence", *Infect Immun*, vol. 6, no. 3, pp. 226-31.
- Ristic, J.M. & Stidworthy, M.F. 2002, "Two cases of severe iron-deficiency anaemia due to inflammatory bowel disease in the dog", *The Journal of small animal practice*, vol. 43, no. 2, pp. 80-83.
- Riviere, J.E. & Spoo, J.W. 2001, "Tetracycline antibiotics" in *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, ed. H.R. Adams, Eighth edn, Iowa State University Press, Ames, Iowa, Estados Unidos, pp. 828-840.
- Rizzi, E., Castro, M.M., Prado, C.M., Silva, C.A., Fazan, R., Jr, Rossi, M.A., Tanus-Santos, J.E. & Gerlach, R.F. 2010, "Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension", *Journal of cardiac failure*, vol. 16, no. 7, pp. 599-608.

- Roberts, M.C. 1996, "Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution", *FEMS microbiology reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 1-24.
- Rodríguez-Franco, F., Sainz, A., Tesouro, M.A., Amusatogui, I. & Cortes, O. 1999, "Pharmacological and dietary treatment of canine malabsorption syndrome: a retrospective study of 17 clinical cases", *Zentralblatt für Veterinärmedizin.Reihe A*, vol. 46, no. 7, pp. 439-452.
- Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M. & Niedzwiecki, A. 2010, "In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors", *Oncology reports*, vol. 23, no. 3, pp. 605-614.
- Saalmuller, A. 2006, "New understanding of immunological mechanisms", *Vet Microbiol*, vol. 117, no. 1, pp. 32-8.
- Sainz, A., Tesouro, M.A., Rodríguez, F., Mayoral, I. & Mazzucchelli, F. 1995, "Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infections in police dogs in Spain", *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 23, pp. 179-182.
- Sainz, A. 1996a, *Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb* (Tesis Doctoral). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Sainz, A., Delgado, S., Amusatogui, I., Tesouro, M.A. & Cármenes, P. 1996b, "Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (north-west Spain)", *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 29, pp. 1-7.
- Sainz, A., Amusatogui, I. & Tesouro, M.A. 1998, "Canine ehrlichiosis in the Comunidad de Madrid in central Spain", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 849, pp. 438-440.
- Sainz, A., Amusatogui, I. & Tesouro, M.A. 1999, "*Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain", *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, vol. 11, no. 4, pp. 382-384.
- Sainz, A., Kim, C.H., Tesouro, M.A., Hansen, R., Amusatogui, I., Koo, H.Y. & Kakoma, I. 2000a, "Serological evidence of exposure to *Ehrlichia species* in dogs in Spain", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 916, pp. 635-642.
- Sainz, A., Tesouro, M.A., Amusatogui, I., Rodríguez, F., Mazzucchelli, F. & Rodríguez, M. 2000b, "Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 14, no. 2, pp. 134-139.
- Sakai, M., Otani, I., Watari, T., Sato, T., Kanayama, K., Takeuchi, A. & Hasegawa, A. 2003, "Phenotypic analysis of hepatic lymphocytes from healthy dogs", *J Vet Med Sci*, vol. 65, no. 1, pp. 157-9.
- Sánchez, M., Frutos, G. & Cuesta, P.L. 1996, *Estadística y matemáticas aplicadas*, Síntesis.
- Schaefer, J.J., Needham, G.R., Bremer, W.G., Rikihisa, Y., Ewing, S.A. & Stich, R.W. 2007, "Tick acquisition of *Ehrlichia canis* from dogs treated with doxycycline hyclate", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no. 9, pp. 3394-3396.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. & Hume, D.A. 2004, "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions", *Journal of leukocyte biology*, vol. 75, no. 2, pp. 163-189.
- Schuberth, H.J., Rabe, H.U., Beer, A. & Leibold, W. 1998, "Crossreactivity of workshop monoclonal antibodies with canine blood leukocytes", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 60, no. 3-4, pp. 419-424.
- Schultz, R.D., Thiel, B., Mukhtar, E., Sharp, P. & Larson, L.J. 2009, "Age and Long-term Protective Immunity in Dogs and Cats", *Journal of comparative pathology*, .
- Schwarz, S. & Chaslus-Dancla, E. 2001, "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance", *Veterinary research*, vol. 32, no. 3-4, pp. 201-225.
- Seder, R.A., Boulay, J.L., Finkelman, F., Barbier, S., Ben-Sasson, S.Z., Le Gros, G. & Paul, W.E. 1992, "CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 148, no. 6, pp. 1652-1656.
- Seedor, J.A., Perry, H.D., McNamara, T.F., Golub, L.M., Buxton, D.F. & Guthrie, D.S. 1987, "Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulceration in rabbits", *Archives of Ophthalmology*, vol. 105, no. 2, pp. 268-271.

- Seftor, E.A., Seftor, R.E., Nieva, D.R. & Hendrix, M.J. 1998a, "Application of chemically modified tetracyclines (CMTs) in experimental models of cancer and arthritis", *Advances in Dental Research*, vol. 12, no. 2, pp. 103-110.
- Seftor, R.E., Seftor, E.A., De Larco, J.E., Kleiner, D.E., Leferson, J., Stetler-Stevenson, W.G., McNamara, T.F., Golub, L.M. & Hendrix, M.J. 1998b, "Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis", *Clinical & experimental metastasis*, vol. 16, no. 3, pp. 217-225.
- Semenzato, G. 1990, "Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities", *British journal of cancer*, vol. 61, no. 3, pp. 354-361.
- Shapiro, H.M. 2003a, "How flow cytometers work" in *Practical flow cytometry*, ed. H.M. Shapiro, Fourth edn, Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, pp. 101-224.
- Shapiro, H.M. 2003b, "Overture" in *Practical flow cytometry*, ed. H.M. Shapiro, Fourth edn, Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, pp. 1-60.
- Shapiro, H.M. 2003c, "Parameters and probes" in *Practical flow cytometry*, ed. H.M. Shapiro, Fourth edn, Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, pp. 273-410.
- Shapiro, H.M. 2003d, "Using flow cytometers: applications, extensions, and alternatives" in *Practical flow cytometry*, ed. H.M. Shapiro, Fourth edn, Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, pp. 443-542.
- Simpson, R.M., Gaunt, S.D., Hair, J.A., Kocan, K.M., Henk, W.G. & Casey, H.W. 1991, "Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 52, no. 9, pp. 1537-1541.
- Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P. & Welsh, M.J. 2002, "A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development", *Nature*, vol. 417, no. 6888, pp. 552-555.
- Sinkora, J., Samankova, P., Kummer, V., Leva, L., Maskova, J., Rehakova, Z. & Faldyna, M. 2007, "Commercially available rabbit anti-human polyclonal antisera as a useful tool for immune system studies in veterinary species", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 119, no. 1-2, pp. 156-162.
- Smith, R.D., Ristic, M., Huxsoll, D.L. & Baylor, R.A. 1975, "Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia", *Infection and immunity*, vol. 11, no. 6, pp. 1216-1221.
- Smith, J.A. 1994, "Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword", *Journal of leukocyte biology*, vol. 56, no. 6, pp. 672-686.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E. 2006, "A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain", *Veterinary research*, vol. 37, no. 2, pp. 231-244.
- Speer, B.S., Shoemaker, N.B. & Salyers, A.A. 1992, "Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance", *Clinical microbiology reviews*, vol. 5, no. 4, pp. 387-399.
- Stanley, F.W., Sieburth, D. & Sypek, J. 1994, "Interleukin 12: A key modulator of immune function", *Stem Cells*, vol. 12, pp. 154-168.
- Stein, V.M., Schreiner, N.M., Moore, P.F., Vandeveld, M., Zurbriggen, A. & Tipold, A. 2008, "Immunophenotypical characterization of monocytes in canine distemper virus infection", *Veterinary microbiology*, vol. 131, no. 3-4, pp. 237-246.
- Steinke, J.W. & Borish, L. 2006, "3. Cytokines and chemokines", *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 117, no. 2 Suppl Mini-Primer, pp. S441-5.
- Stern, A.S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T. & Chizzonite, R. 1990, "Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 17, pp. 6808-6812.
- Stevenson, H.L., Jordan, J.M., Peerwani, Z., Wang, H.Q., Walker, D.H. & Ismail, N. 2006, "An intradermal environment promotes a protective type-1 response against lethal systemic monocytotropic ehrlichial infection", *Infection and immunity*, vol. 74, no. 8, pp. 4856-4864.
- Stiles, J. 2000, "Canine rickettsial infections", *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, vol. 30, no. 5, pp. 1135-1149.

- Strasser, A., Teltscher, A., May, B., Sanders, C. & Niedermuller, H. 2000, "Age-associated changes in the immune system of German shepherd dogs", *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, vol. 47, no. 3, pp. 181-192.
- Street, N.E. & Mosmann, T.R. 1991, "Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 5, no. 2, pp. 171-177.
- Sun, W., IJdo, J.W., Telford, S.R., 3rd, Hodzic, E., Zhang, Y., Barthold, S.W. & Fikrig, E. 1997, "Immunization against the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model", *The Journal of clinical investigation*, vol. 100, no. 12, pp. 3014-3018.
- Suomalainen, K., Sorsa, T., Golub, L.M., Ramamurthy, N., Lee, H.M., Uitto, V.J., Saari, H. & Kontinen, Y.T. 1992, "Specificity of the anticollagenase action of tetracyclines: relevance to their anti-inflammatory potential", *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 36, no. 1, pp. 227-9.
- Takaoka, A. & Yanai, H. 2006, "Interferon signalling network in innate defence", *Cellular microbiology*, vol. 8, no. 6, pp. 907-922.
- Taniguchi, T. & Takaoka, A. 2002, "The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors", *Current opinion in immunology*, vol. 14, no. 1, pp. 111-116.
- Tasca, S., Carli, E., Caldin, M., Menegazzo, L., Furlanello, T. & Gallego, L.S. 2009, "Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006)", *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, vol. 38, no. 1, pp. 2-12.
- Tauber, S.C. & Nau, R. 2008, "Immunomodulatory properties of antibiotics", *Current molecular pharmacology*, vol. 1, no. 1, pp. 68-79.
- Taylor, D.E. & Chau, A. 1996, "Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, no. 1, pp. 1-5.
- Tesouro, M.A. 1984, *Aspectos clínicos y laboratoriales del diagnóstico de la leishmaniosis canina. Estudio epizootiológico en la provincia de Madrid*. Tesis Doctoral. Departamento de Patología General y Médica. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Thirumalapura, N.R., Stevenson, H.L., Walker, D.H. & Ismail, N. 2008, "Protective heterologous immunity against fatal ehrlichiosis and lack of protection following homologous challenge", *Infection and immunity*, vol. 76, no. 5, pp. 1920-1930.
- Thirumalapura, N.R., Crossley, E.C., Walker, D.H. & Ismail, N. 2009, "Persistent infection contributes to heterologous protective immunity against fatal ehrlichiosis", *Infection and immunity*, vol. 77, no. 12, pp. 5682-5689.
- Thong, Y.H. & Ferrante, A. 1979, "Inhibition of mitogen-induced human lymphocyte proliferative responses by tetracycline analogues", *Clinical and experimental immunology*, vol. 35, no. 3, pp. 443-446.
- Thong, Y.H. & Ferrante, A. 1980, "Effect of tetracycline treatment on immunological responses in mice", *Clinical and experimental immunology*, vol. 39, no. 3, pp. 728-732.
- Tilley, B.C., Alarcon, G.S., Heyse, S.P., Trentham, D.E., Neuner, R., Kaplan, D.A., Clegg, D.O., Leisen, J.C., Buckley, L., Cooper, S.M., Duncan, H., Pillemer, S.R., Tuttleman, M. & Fowler, S.E. 1995, "Minocycline in rheumatoid arthritis. A 48-week, double-blind, placebo-controlled trial. MIRA Trial Group", *Annals of Internal Medicine*, vol. 122, no. 2, pp. 81-89.
- Tizard, I.R. 2009a, "Acquired immunity to bacteria and fungi" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 286-296.
- Tizard, I.R. 2009b, "Acquired immunity to viruses" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 297-311.
- Tizard, I.R. 2009c, "Antibodies: soluble antigen receptors" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 170-180.
- Tizard, I.R. 2009d, "Antigens: Triggers of acquired immunity" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 70-80.

- Tizard, I.R. 2009e, "B cells and their response to antigen" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 152-169.
- Tizard, I.R. 2009f, "Cell signaling: Cytokines and their receptors" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 70-80.
- Tizard, I.R. 2009g, "The Complement System" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 57-69.
- Tizard, I.R. 2009h, "The Defense of the Body" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1-10.
- Tizard, I.R. 2009i, "Dendritic cells and antigen processing" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 89-100.
- Tizard, I.R. 2009j, "The Evolution of the Immune System" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 490-508.
- Tizard, I.R. 2009k, "Helper T cells and their response to antigen" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 139-151.
- Tizard, I.R. 2009l, "How inflammation is triggered" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 11-27.
- Tizard, I.R. 2009m, "Immunodiagnostic techniques" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 509-527.
- Tizard, I.R. 2009n, "Lymphocytes" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 128-138.
- Tizard, I.R. 2009o, "Macrophages and the later stages of inflammation" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 41-56.
- Tizard, I.R. 2009p, "The major histocompatibility complex" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 101-111.
- Tizard, I.R. 2009q, "Neutrophils and their products" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 28-40.
- Tizard, I.R. 2009r, "Organs of the immune system" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 112-127.
- Tizard, I.R. 2009s, "Resistance to tumors" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 392-407.
- Tizard, I.R. 2009t, "T cell function and the destruction of cell-associated invaders" in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth edn, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 196-208.
- Tracey, K.J., Wei, H., Manogue, K.R., Fong, Y., Hesse, D.G., Nguyen, H.T., Kuo, G.C., Beutler, B., Cotran, R.S. & Cerami, A. 1988, "Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation", *The Journal of experimental medicine*, vol. 167, no. 3, pp. 1211-1227.
- Trinchieri, G. 1989, "Biology of natural killer cells", *Advances in Immunology*, vol. 47, pp. 187-376.
- Trinchieri, G. 1995, "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity", *Annual Review of Immunology*, vol. 13, pp. 251-276.
- Unver, A., Huang, H. & Rikihisa, Y. 2006, "Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1078, pp. 482-486.
- Vachieri, N., Trap, I., Totte, P., Martinez, D. & Bensaid, A. 1998, "Inhibition of MHC class I and class II cell surface expression on bovine endothelial cells upon infection with *Cowdria ruminantium*", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 61, no. 1, pp. 37-48.
- Van den Bogert, C. & Kroon, A.M. 1982, "Effects of oxytetracycline on in vivo proliferation and differentiation of erythroid and lymphoid cells in the rat", *Clinical and experimental immunology*, vol. 50, no. 2, pp. 327-335.

- van Heeckeren, A.M., Rikihisa, Y., Park, J. & Fertel, R. 1993, "Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, interleukin-6, and prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophages infected with *Ehrlichia risticii*", *Infection and immunity*, vol. 61, no. 10, pp. 4333-4337.
- Vernau, W. & Moore, P.F. 1999, "An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 69, no. 2-4, pp. 145-164.
- Vigouroux, S., Yvon, E., Biagi, E. & Brenner, M.K. 2004, "Antigen-induced regulatory T cells", *Blood*, vol. 104, no. 1, pp. 26-33.
- Vivier, E. 2006, "What is natural in natural killer cells?", *Immunology letters*, vol. 107, no. 1, pp. 1-7.
- Walker, D.H., Ismail, N., Olano, J.P., McBride, J.W., Yu, X.J. & Feng, H.M. 2004, "*Ehrlichia chaffeensis*: a prevalent, life-threatening, emerging pathogen", *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, vol. 115, pp. 375-82; discussion 382-4.
- Weisiger, R.M., Ristic, M. & Huxsoll, D.L. 1975, "Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 36, no. 5, pp. 689-694.
- Waner, T., Harrus, S., Weiss, D.J., Bark, H. & Keysary, A. 1995, "Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 48, no. 1-2, pp. 177-82.
- Waner, T., Leykin, I., Shinitsky, M., Sharabani, E., Buch, H., Keysary, A., Bark, H. & Harrus, S. 2000a, "Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 77, no. 1-2, pp. 145-50.
- Waner, T., Strenger, C. & Keysary, A. 2000b, "Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs", *J Vet Diagn Invest*, vol. 12, no. 3, pp. 240-4.
- Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A. & Cornelissen, A.W. 2001, "Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*", *Vet Parasitol*, vol. 95, no. 1, pp. 1-15.
- Weiss, D.J. 2001, "Evaluation of proliferative disorders in canine bone marrow by use of flow cytometric scatter plots and monoclonal antibodies", *Veterinary pathology*, vol. 38, no. 5, pp. 512-518.
- Welch, W.D., Davis, D. & Thrupp, L.D. 1981, "Effect of antimicrobial agents on human polymorphonuclear leukocyte microbicidal function", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 20, no. 1, pp. 15-20.
- Whist, S.K., Storset, A.K., Johansen, G.M. & Larsen, H.J. 2003, "Modulation of leukocyte populations and immune responses in sheep experimentally infected with *Anaplasma* (formerly *Ehrlichia*) *phagocytophilum*", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 94, no. 3-4, pp. 163-75.
- Wikby, A., Maxson, P., Olsson, J., Johansson, B. & Ferguson, F.G. 1998, "Changes in CD8 and CD4 lymphocyte subsets, T cell proliferation responses and non-survival in the very old: the Swedish longitudinal OCTO-immune study", *Mechanisms of ageing and development*, vol. 102, no. 2-3, pp. 187-198.
- Wilkerson, M.J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garrett, L., Barber, L. & Avery, A. 2005, "Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules", *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 106, no. 3-4, pp. 179-96.
- Williams, D.L. 1997, "Studies of canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology", *Veterinary journal (London, England : 1997)*, vol. 153, no. 1, pp. 31-39.
- Williams, M.A. & Bevan, M.J. 2007, "Effector and memory CTL differentiation", *Annual Review of Immunology*, vol. 25, pp. 171-192.
- Williams, M.J., Avery, A.C., Lana, S.E., Hillers, K.R., Bachand, A.M. & Avery, P.R. 2008, "Canine lymphoproliferative disease characterized by lymphocytosis: immunophenotypic markers of prognosis", *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, vol. 22, no. 3, pp. 596-601.
- Wilson, R.C., Kemp, D.T., Kitzman, J.V. & Goetsch, D.D. 1988, "Pharmacokinetics of doxycycline in dogs", *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, vol. 52, no. 1, pp. 12-14.

- Winnicka, A., Jagielski, D., Hoffmann-Jagielska, M. & Lechowski, R. 2002, "Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy", *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, vol. 49, no. 6, pp. 303-306.
- Winslow, G.M., Yager, E., Shilo, K., Volk, E., Reilly, A. & Chu, F.K. 2000, "Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection", *Infect Immun*, vol. 68, no. 4, pp. 2187-95.
- Woldehiwet, Z. 1987a, "Depression of lymphocyte response to mitogens in sheep infected with tick-borne fever", *Journal of comparative pathology*, vol. 97, no. 6, pp. 637-643.
- Woldehiwet, Z. 1987b, "The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep", *Journal of comparative pathology*, vol. 97, no. 4, pp. 481-485.
- Woldehiwet, Z. 1991, "Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever", *Research in veterinary science*, vol. 51, no. 1, pp. 40-43.
- Woldehiwet, Z. 2010, "The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*", *Veterinary parasitology*, vol. 167, no. 2-4, pp. 108-122.
- Wolf, L., McPherson, T., Harrison, B., Engber, B., Anderson, A. & Whitt, P. 2000, "Prevalence of *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* in North Carolina", *Journal of clinical microbiology*, vol. 38, no. 7, pp. 2795.
- Wong, S.J. & Thomas, J.A. 1998, "Cytoplasmic, nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients", *Journal of clinical microbiology*, vol. 36, no. 7, pp. 1959-1963.
- Woody, B.J. & Hoskins, J.D. 1991, "Ehrlichial diseases of dogs", *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, vol. 21, no. 1, pp. 75-98.
- Yager, E., Bitsakis, C., Nandi, B., McBride, J.W. & Winslow, G. 2005, "Essential role for humoral immunity during *Ehrlichia infection* in immunocompetent mice", *Infect Immun*, vol. 73, no. 12, pp. 8009-16.
- Yagi, Y., Shiono, H., Kurabayashi, N., Yoshihara, K. & Chikayama, Y. 2000, "Flow cytometry to evaluate *Theileria sergenti* parasitemia using the fluorescent nucleic acid stain, SYTO16", *Cytometry*, vol. 41, no. 3, pp. 223-225.
- Yamashita, K., Fujinaga, T., Hagio, M., Miyamoto, T., Izumisawa, Y. & Kotani, T. 1994, "Bioassay for interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-like activities in canine sera", *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, vol. 56, no. 1, pp. 103-107.
- Yoshiie, K., Kim, H.Y., Mott, J. & Rikihisa, Y. 2000, "Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis", *Infection and immunity*, vol. 68, no. 3, pp. 1125-1133.
- Yoshimoto, T. 2010, "Basophils as T(h)2-inducing antigen-presenting cells", *International immunology*, vol. 22, no. 7, pp. 543-550.
- Young, H.A. & Hardy, K.J. 1995, "Role of interferon-gamma in immune cell regulation", *Journal of leukocyte biology*, vol. 58, no. 4, pp. 373-381.
- Zanetti, M. 2004, "Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity", *Journal of leukocyte biology*, vol. 75, no. 1, pp. 39-48.
- Zanjani, T.M., Sabetkasaei, M., Mosaffa, N., Manaheji, H., Labibi, F. & Farokhi, B. 2006, "Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain", *European journal of pharmacology*, vol. 538, no. 1-3, pp. 66-72.
- Zhang, J.Z., Sinha, M., Luxon, B.A. & Yu, X.J. 2004, "Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles", *Infection and immunity*, vol. 72, no. 1, pp. 498-507.
- Zurawski, G. & de Vries, J.E. 1994, "Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells", *Immunology today*, vol. 15, no. 1, pp. 19-26.