

Lourdes Soler Baigorri

Desarrollo de metodologías analíticas y estudios sobre la aplicabilidad de las proteínas de fase aguda como biomarcadores de salud y bienestar animal en el perro. Caracterización de ITIH4 como nueva proteína de fase

Director/es

Piñeiro Pardo, Matilde
Lampreave Palacios, Fermín

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS
Y ESTUDIOS SOBRE LA APLICABILIDAD DE LAS
PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO
BIOMARCADORES DE SALUD Y BIENESTAR
ANIMAL EN EL PERRO. CARACTERIZACIÓN DE
ITIH4 COMO NUEVA PROTEÍNA DE FASE AGUDA
CANINA

Autor

Lourdes Soler Baigorri

Director/es

Piñeiro Pardo, Matilde
Lampreave Palacios, Fermín

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2019



Universidad Zaragoza

Tesis Doctoral

**Desarrollo de metodologías analíticas y estudios sobre la
aplicabilidad de las proteínas de fase aguda como
biomarcadores de salud y bienestar animal en el perro
Caracterización de ITIH4 como nueva proteína de fase
aguda canina**

Memoria presentada por

Lourdes Soler Baigorri

Para optar al Grado de Doctor

en Bioquímica y Biología Molecular

Zaragoza, diciembre 2018



D. Fermín Lampreave Palacios, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

D^a. Matilde Piñeiro Pardo, Doctora en Ciencias Químicas, Directora I+D de la empresa Acuvet Biotech, Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “Desarrollo de metodologías analíticas y estudios sobre la aplicabilidad de las PFAs como biomarcadores de salud y bienestar animal en el perro. Caracterización de ITIH4 como nueva proteína de fase aguda canina”, presentada por la Licenciada en Bioquímica D^a Lourdes Soler Baigorri, ha sido realizada bajo su dirección cumpliendo los requisitos exigidos en la legislación vigente para optar al Grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular.

Zaragoza, 17 de diciembre de 2018

Fermín Lampreave Palacios

Matilde Piñeiro Pardo

Para la realización de esta tesis se ha recibido financiación del Programa Doctorado Industrial, *Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016*.

Cuando miro atrás todavía puedo verme sentada en la cocina de mi casa eligiendo que carrera estudiar, “mi futuro”. Todavía veo a mi madre cautelosa, y a mi padre alentándome para hacer lo que siempre había querido. Ha pasado mucho tiempo desde entonces y aquí estoy escribiendo estas líneas para agradecer a todos los que me habéis apoyado durante este recorrido.

Quiero empezar por mis directores de tesis, sin los cuales no habría sido capaz de realizar este trabajo. Al Dr. Fermín Lampreave, por ser la primera persona en confiar en mí y darme la oportunidad de empezar en un laboratorio. A la Dra Matilde Piñeiro por pensar en mí para este proyecto y por permitirme aprender a tu lado. Ambos personas muy diferentes pero de las cuales he aprendido muchísimo.

Esta tesis no hubiera podido ser realizada sin la ayuda de todos los colaboradores que nos han proporcionado las muestras de suero utilizadas en cada uno de los estudios: gracias a la Dra Ana Bassols, la Dra Amaya Unzueta, al Dr Roman Dabrowski y al Dr Juan Antonio Castillo. Así como la Dra Paz Peris, por tu ayuda con mis múltiples dudas sobre Leishmania.

A Juan Carlos Ortiz, Presidente de la Asociación Española de Veterinarios Municipales (AVEM), por la posibilidad de haber realizado este estudio en colaboración, que nos ha permitido evaluar las PFAs como marcadores de bienestar animal. Igualmente me gustaría agradecer a todos los veterinarios responsables de los centros de protección su implicación y colaboración en este estudio.

A todos los compañeros de ZEULAB, GTZ y ACUVET, gracias por vuestra acogida, desde el primer día me habéis hecho sentir una más. Tanto por las actividades de la empresa, los campeonatos de fútbolín y de comer polvorones, las carreras de las empresas, los show cocking room, las cenas... y como no, por vuestra profesionalidad, hacéis que trabajar con cada uno de vosotros sea un verdadero placer. Empezando por el Dr Pedro Razquín y continuando por todos y cada uno de los departamentos. Al departamento técnico, con el Dr Luis Mata a la cabeza siguiendo por cada uno de los laboratorios desde L1 a L11, en especial a

mis “Batas verdes”, y sin olvidarme de las chicas y chico de la sala limpia. Tampoco puedo olvidarme de las chicas de expedición, ni de todo departamento comercial, de recursos humanos y facturación. Y como no, de esos compañeros de la sala de ordenadores con quienes se puede hablar de cualquier cosa.

No puedo olvidarme de todas las personas de la Facultad de Ciencias, lugar donde empecé, y al que cada vez que he vuelto me habéis recibido con una sonrisa y me habéis hecho sentir como si volviera a casa.

A la Dra M^a Ángeles Álava, por tu cercanía, amabilidad y tus consejos, tanto en el ámbito personal como profesional. A los doctores Javier Naval, Isabel Marzo, Alberto Anel y María Iturralde, por vuestro interés en mis progresos. A Marta Fajes, por ser una persona tan eficiente y resolverme las dudas con los papeleos, así como a los técnicos Pili, Ismael y Manoli.

Y a esos compañeros y amigos, a los que ya terminasteis, Rubén, Diego de Miguel, Vidal, Paula, Oscar, David, Leo, Natalia García y Natalia Ramirez, y los que todavía continuáis, Ana, Joaquín, Alfonso, Laura, Pilar, Gipsy, Maykel. Los ratos del café y las comidas con vosotros eran apasionantes a la par que divertidísimas, y lo mejor de todo es, que cada vez que nos volvemos a juntar parece que no hubiera pasado el tiempo y vuelven a salir las mismas historias.

Al Profesor David Eckersall, quien amablemente me acogió en su laboratorio, y a todos los compañeros de Glasgow, por hacer mi estancia lo más agradable posible.

A mis amigos de la infancia, los de toda la vida. Esa gran cuadrilla que aunque nos veamos menos de los que quisiéramos, y ya va siendo complicado reunirnos a todos juntos, siempre estamos cuando nos necesitamos. Mila, Talitha, Itxaso, María, Mapi, Mayte, Ana, Patricia, Iker, Moi, Jorge, Juanjo, Aitor, Noé, Javi, Jose M^a y Rubén. Hemos compartido mucho juntos, y seguiremos compartiéndolo, más aún con esta segunda generación del “Gazongazo” que llega pisando fuerte.

A mi familia, porque a vosotros os debo lo que soy y hasta donde he llegado. A mis padres, Benito y Charo, y mi tío, Juan José, por su apoyo incondicional, enseñarme el valor de las cosas y por quererme tanto. A mi hermano, Rubén, gracias por estar siempre a mi lado. A Patricia, también mi “hermana”, por tu forma de ver la vida, y a ambos por regalarnos lo más bonito de este mundo, a Lea, esa pequeña personita que en poco más de un año nos ha alegrado la vida a todos.

Y no podía dejarme a la persona que más me ha ayudado en esta última etapa de mi vida, Álvaro, gracias por tu apoyo incondicional, tu paciencia, por aportarme la calma que necesito y por tus palabras de ánimo. Y por hacerme ver, y cito palabras textuales, que esto es *mi trabajo, mi humildad, mi sabiduría, mi capacidad, mi perseverancia, mi ilusión y mi vida*. Que el objetivo no solo es llegar, sino llegar disfrutando del camino, porque *el que escribe sangra...*

1	INTRODUCCIÓN	15
1.1	La respuesta de fase aguda.....	17
1.1.1	Regulación de los cambios de fase aguda y síntesis de las PFAs	20
1.1.2	Función general de las proteínas de fase aguda en la defensa del organismo	23
1.2	Proteínas de fase aguda, características bioquímicas y función	24
1.3	Proteínas de fase aguda como biomarcadores en medicina canina	38
1.4	Métodos analíticos para la determinación de PFAs en especie canina	41
1.5	Piometra canina	45
1.5.1	Diagnóstico y tratamiento de la piometra canina	46
1.6	Leishmaniosis canina.....	47
1.6.1	Ciclo de vida del parásito	48
1.6.2	Sintomatología y diagnóstico	50
1.7	Proteínas de fase aguda como marcadores de bienestar animal.....	52
2	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	57
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1	Técnicas electroforéticas	65
3.1.1	Electroforesis en gel de Poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	65
3.1.2	Transferencia de proteínas a membranas	65
3.1.3	Tinción de proteínas.....	66
3.2	Purificación de proteínas.....	66
3.2.1	Purificación de CRP	66
3.2.2	Purificación de ITIH4.....	67
3.2.3	Purificación de Haptoglobina.....	68
3.2.4	Purificación de α_1 -glicoproteína ácida	69

3.3	Concentración de soluciones proteicas por ultrafiltración.....	70
3.3.1	Concentración de muestras por presión de nitrógeno	70
3.3.2	Ultrafiltración impulsada por centrifugación	70
3.4	Cuantificación de proteína total.....	71
3.5	Identificación de proteínas	72
3.5.1	MALDI TOF MS.....	72
3.5.2	LC-MS/MS.....	72
3.6	Métodos inmunoquímicos	73
3.6.1	Preparación de antisueros	73
3.6.2	Preparación de columnas de inmunoafinidad	77
3.6.3	Obtención de anticuerpos	78
3.6.4	Técnicas de inmunoprecipitación en gel	79
3.6.5	Métodos inmunoenzimáticos.....	81
3.6.6	Método inmunoturbidimétrico para la cuantificación de CRP canina ..	85
3.7	Validación de métodos analíticos.....	85
3.8	Determinación de PFAs en modelos experimentales	87
3.8.1	Medida de los niveles de PFAs en muestras de cirugía mayor	87
3.8.2	Caracterización de los niveles de ITIH4 en perras afectadas por piometra.....	88
3.8.3	PFA en sueros e hígados de perros infectados con <i>L. infantum</i> . Estudio 1.....	90
3.8.4	Evolución de las PFAs en animales infectados con <i>L. infantum</i> . Estudio 2.....	93
3.8.5	Asignación de valores de PFAs en animales sanos	96
3.8.6	Evaluación de los niveles de PFA en perros alojados en Centros de Protección.....	97

4	RESULTADOS.....	99
4.1	Purificación de proteínas y obtención de antisueros.....	101
4.1.1	Purificación de ITIH4 canina y obtención de antisueros	101
4.1.2	Purificación CRP canina y obtención de antisueros.	103
4.1.3	Purificación de haptoglobina canina y obtención de antisueros.	105
4.1.4	Purificación de α_1 glicoproteína ácida canina y obtención de antisueros.....	109
4.2	Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de PFAs caninas	111
4.2.1	Desarrollo y validación de métodos de inmunodifusión radial para la cuantificación de ITIH4, CRP, Hp y GPA caninas	111
4.2.2	Desarrollo y validación de un ELISA para la determinación de ITIH4 canina	118
4.2.3	Desarrollo y validación de un ELISA para la determinación de Hp canina	121
4.2.4	Método turbidimétrico para la cuantificación de CRP canina. Adaptación para su uso en placa microtiter.	124
4.3	Caracterización de ITIH4 como PFA en el perro. Modelos experimentales	129
4.3.1	Estudio en muestras de perros sometidos a cirugía mayor.	129
4.3.2	Caracterización de los niveles de ITIH4 en el suero de perras afectadas por piometra.....	132
4.3.3	Proteínas de fase aguda tras infección experimental con <i>L. infantum</i>	136
4.4	Asignación de los valores de referencia para las PFAs en animales sanos	149
4.5	Evaluación de los niveles de PFAs en centros de protección.....	156
4.5.1	Evolución de los animales en los centros	156
4.5.2	Niveles de CRP en animales alojados en centros de protección animal. Estudio 2.	170

Índice

5	DISCUSIÓN.....	177
5.1	Purificación de proteínas y obtención de antisueros.....	179
5.2	Desarrollo y validación de métodos analíticos.....	183
5.3	Respuesta de ITIH4 durante la fase aguda.....	189
5.4	Niveles de PFA en perras afectadas por piometra.....	195
5.5	PFA como biomarcadores en <i>L. infantum</i>	198
5.6	Niveles de referencia de las PFAs.....	206
5.7	Niveles de PFA en perros alojados en centros de protección animal. PFAs en la evaluación del bienestar animal.....	208
6	CONCLUSIONES.....	215
7	BIBLIOGRAFÍA.....	219
8	ANEXOS.....	244
9	ÍNDICE DE TABLAS.....	253
10	ÍNDICE DE FIGURAS.....	257
11	ABREVIATURAS.....	263

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La respuesta de fase aguda.

La respuesta de fase aguda (RFA) es una reacción compleja y no específica de un animal tras un daño tisular producido tanto por agentes externos como internos. Atendiendo a su naturaleza, el agente puede ser físico (traumatismos, cirugías, quemaduras...), químico (irritación por tóxicos) o biológico (infección, crecimiento tumoral, alteraciones inmunológicas...). Esta respuesta se considera parte del sistema innato de defensa del organismo y actúa como predecesora de la respuesta inmune adquirida. Se genera durante las primeras etapas del ataque y es la responsable de la supervivencia del individuo. En el sitio de lesión se genera una inflamación localizada y muy controlada ya que trata de adecuarse a la magnitud de la amenaza. (Kushner 1982; Gabay et al., 1999; Eckersall 2000).

El inicio y la progresión de la RFA responden a una reacción coordinada por los mediadores de inflamación. Las citoquinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina-1 (IL-1) e interleuquina-6 (IL-6), son los mediadores más importantes en el inicio de la RFA. Estas citoquinas inducen un número de respuestas locales y sistémicas. Al inicio de la respuesta se observan cambios en el calibre, permeabilidad y flujo vasculares. Se produce la acreción de leucocitos a las zonas inflamadas y si es necesario se activan las vías de coagulación y del complemento para el desarrollo de una respuesta de defensa óptima. El tejido inflamado y el sistema vascular circundante libera una segunda oleada de citoquinas que actúan sobre los órganos diana dando lugar a una reacción sistémica en la que se producen numerosos cambios fisiológicos, metabólicos y endocrinos (Ceciliani et al., 2002) (Tabla 1).

Introducción

Tabla 1. Cambios neuroendocrinos, metabólicos, hematopoyéticos y hepáticos producidos en el organismo durante la respuesta de fase aguda.

Cambios neuroendocrinos	Fiebre, pérdida de apetito y somnolencia Aumento de la secreción de ACTH (hormona adrenocorticotrópica), cortisol y catecolaminas
Cambios metabólicos	Aumento del catabolismo protéico Producción hepática de las Proteínas de Fase Aguda Aumento de la lipogénesis hepática Aumento de la lipólisis del tejido adiposo Disminución de la masa ósea Aumento de la gluconeogénesis Disminución de la proteín lipasa en músculo y tejido adiposo Hipertrigliceridemia e hipocolesterolemia
Cambios hematopoiéticos	Anemia (en enfermedades crónicas) Leucocitosis Trombocitosis
Cambios en constituyentes plasmáticos no protéicos	Hipozinquemia, hipoferremia e hipercupremia Aumento de las concentraciones plasmáticas de retinol y glutatión

Cecilliani et al., 2002. Protein and Peptide Letters

El sistema nervioso y el sistema endocrino se ven afectados y estimulados por las citoquinas pro-inflamatorias, produciéndose alteraciones en el comportamiento, cambios fisiológicos, bioquímicos y nutricionales. La activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal es una de las principales características neuroendocrinas de la RFA, que se traduce en la liberación de sustancias como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), y el aumento en los niveles de cortisol

Introducción

(Borghetti et al., 2009). Una de las principales manifestaciones clínicas es la fiebre. Se cree que la fiebre puede ser una respuesta a la IL-6 mediante la producción de prostaglandinas, otros mediadores que afectan al hipotálamo (Dinarello 2004). Igualmente se observan cambios en la concentración sérica de iones como hierro y cinc, así como es su redistribución en los tejidos donde ejercen una actividad antioxidante (Borghetti et al., 2009).

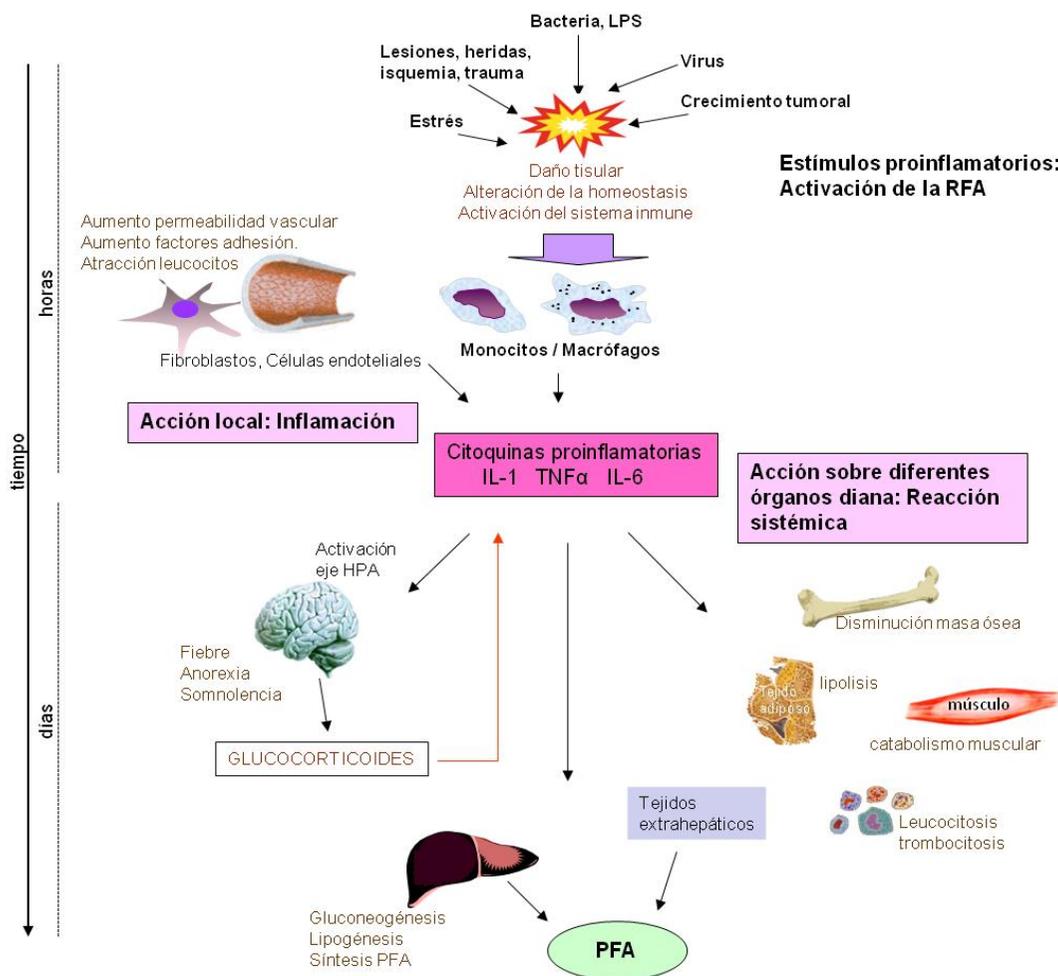


Figura 1. Esquema de la respuesta de fase aguda. Fecha roja representa efecto inhibitorio

Uno de los principales cambios metabólicos que se producen en el organismo es el cambio en la síntesis de las proteínas de fase aguda (PFAs) (Gabay et al., 1999). Estas proteínas pertenecen al grupo de proteínas plasmáticas cuya concentración cambia, al menos un 25 % su concentración basal, como respuesta a estímulos internos o externos en el organismo. El hígado es el principal órgano que sintetiza PFAs, y su concentración plasmática se ve alterada como consecuencia de las alteraciones de tamaño, ultraestructura y actividad metabólica producidas en este órgano (Kushner 1982). La producción de las PFAs en el hígado viene estimulada por las citoquinas pro-inflamatorias, concretamente la inducción de la expresión de estas proteínas se produce en los hepatocitos. Además de la producción hepática, las PFAs pueden ser sintetizadas por otros tejidos como la glándula mamaria (Gronlund et al., 2003; Eckersall et al., 2006), la glándula salival (Lecchi et al., 2009), el tracto gastrointestinal (Vreugdenhil et al., 1999), los riñones y los pulmones (Ramadori et al., 1985) entre otros. Sin embargo, la aportación extra-hepática a las concentraciones plasmáticas durante la fase aguda es pequeña.

1.1.1 Regulación de los cambios de fase aguda y síntesis de las PFAs

Los monocitos/macrófagos desempeñan un papel fundamental en el inicio de la cascada de eventos que se desencadenan durante la RFA. Los macrófagos presentan en su superficie receptores de patrones de reconocimiento (TLR, Toll Like Receptors), que pueden interactuar con determinadas estructuras moleculares compartidas por los microorganismos y que se denominan PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos). La interacción entre las secuencias PAMP y TLR produce la activación de rutas que activan al factor nuclear NF- κ B, que una vez activado, migra desde el citoplasma al núcleo e induce la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias (García De Lorenzo Y Mateos et al., 2000).

La síntesis y liberación de las PFAs se atribuye al efecto de los mediadores de inflamación liberados por los monocitos, los macrófagos y células estromales

activadas. Estos mediadores de inflamación pueden agruparse en cuatro categorías, citoquinas de tipo IL-6, citoquinas de tipo IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , TNF β), glucocorticoides y factores de crecimiento. Las citoquinas actúan como estimuladoras de la expresión génica de las PFA, mientras que los glucocorticoides y los factores de crecimiento modulan la actividad de las propias citoquinas. (Baumann et al., 1994).

Las primeras citoquinas liberadas tras el estímulo son el TNF α y la IL-1 β , cada una de las cuales estimula la producción de la otra. La expresión de TNF α , IL-1 e INF- γ es crucial para la expresión de otros mediadores como prostaglandinas y leucotrienos, que a su vez inducen la expresión del factor activador de las plaquetas y otras citoquinas (IL-6, IL-8). La síntesis de la IL-6 viene estimulada por TNF α e IL-1, y a su vez la IL-6 estimula su propia producción e inhibe la síntesis de TNF α e IL-1. La liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10) también disminuye la producción de TNF α e IL-1 en los monocitos. La unión de los mediadores de inflamación a sus respectivos receptores en los hepatocitos y la transducción de esta señal, induce cambios en la expresión génica de las PFAs (Baumann et al., 1994).

Según el tipo de mediadores que regulan su síntesis, se suele hablar de dos tipos de PFAs. Las PFAs de tipo I, aquellas inducidas por citoquinas de tipo IL-1, y las PFAs de tipo II, las inducidas por citoquinas del tipo IL-6. La IL-6 es capaz de estimular directamente la síntesis de la mayoría de las PFAs (Castell et al., 1989) y también puede actuar de forma sinérgica con las citoquinas de tipo IL-1 en la estimulación de las PFAs de tipo I. Las citoquinas de tipo IL-1, no son capaces de estimular directamente la síntesis de las proteínas de tipo II y si tienen algún efecto sobre su síntesis suele ser de tipo inhibitorio (Baumann et al., 1994). La GPA, el componente C3 del complemento, el SAA, la Hp de rata, la CRP y la Apo A-I son PFAs de tipo I, mientras que la ITIH4, el fibrinógeno, la Hp humana, la α 1-antitripsina y la ceruloplasmina son de tipo II (Piñeiro et al., 1999; Gonzalez-Ramon et al., 2000; Haas et al., 2003; Navarro et al., 2005). Entre las citoquinas de tipo IL-6, además de la propia IL-6 se encuentran otras como la oncostatina M

(OSM), la IL-11 o el factor inhibidor de la leucemia (LIF), que también regulan la síntesis de las PFAs de tipo II. Sin embargo su efecto sobre la síntesis de las PFAs es menor que el de la IL-6 (Fukuda et al., 1993).

La activación de eje hipotalámico-pituitario-adrenal mediante estas citoquinas de alarma, provoca la liberación de glucocorticoides generando un sistema de retroalimentación negativa que inhibe la expresión génica y por tanto la producción de las citoquinas pro-inflamatorias (Baumann 1993, Jefferson 1985). Sin embargo, en algunos experimentos in vitro se ha visto que, entre los glucocorticoides, la dexametasona es capaz de estimular por sí sola la síntesis de algunas PFAs, como la Hp bovina (Higuchi 1994) o la GPA y la fibronectina de rata.

Entre los factores de crecimiento, el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) actúa de forma antagónica a la IL-6 y estimula la síntesis de las PFAs negativas como la albúmina o la transferrina, e inhibe la síntesis de la Hp y la α 1-antiquimiotripsina en hepatocitos humanos. Además ese factor estimula la síntesis de la α 2-macroglobulina que no se considera una PFA humana (Guillen et al., 1996).

La RFA es el resultado de la actuación de un gran número de mediadores y cofactores, y algunos de ellos, posiblemente, todavía desconocidos, que actúan sinérgicamente, esto explicaría la enorme complejidad y la diversidad del fenómeno. La terminación de la RFA, viene mediada por la vida media de los mediadores pro-inflamatorios y por la producción de citoquinas anti-inflamatorias entre las que se incluyen IL-10, IL-4, IL-13 y TGF- β . Una de las funciones de la IL-10 es inhibir la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α . La IL-4 es capaz de inhibir la síntesis de CRP, Hp y albúmina en hepatocitos humanos (Loyer et al., 1993). Los excesos de las citoquinas pro-inflamatorias pueden eliminarse mediante receptores solubles de citoquinas o por receptores antagonistas, así como también pueden ser bloqueadas por los glucocorticoides (revisado en Koj 1998).

Por tanto, la terminación de la RFA parece ser tan compleja como los mecanismos implicados en su inicio.

1.1.2 Función general de las proteínas de fase aguda en la defensa del organismo

Aproximadamente unas 40 proteínas son consideradas PFAs (Gabay et al., 1999). Algunas de estas proteínas pertenecen a los sistemas de coagulación o del complemento, otras son proteínas de transporte, otras participan en la respuesta inflamatoria o son inhibidores de proteasas. De esta manera, es probable que muchas PFAs tengan la capacidad para influir en uno o en varios de los eventos desencadenados durante la inflamación participando en el sistema de defensa del organismo (Ceciliani et al., 2002).

La inflamación es un proceso complejo y finamente regulado en el que participan muchos tipos de células y moléculas. Algunas de estas moléculas involucradas son multifuncionales y contribuyen tanto a la iniciación como al control de la inflamación en los diferentes estados por los que transcurre hasta su resolución (Kushner 1998). El objetivo de la respuesta inflamatoria es la recuperación de la homeostasis amenazada por agentes externos e internos, que va acompañada, a menudo, de unos daños colaterales para el organismo, como la destrucción de tejidos causada por los radicales libres liberados durante la RFA. Es por ello, por lo que es importante la actividad antioxidante de las PFAs Hp (Alayash 2011), hemopexina (Delanghe et al., 2001) y ceruloplasmina (Patel et al., 2002), frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS).

En contraste, otras PFAs, tienen una función pro-inflamatoria importante. En las primeras etapas de la respuesta inflamatoria se produce la activación del complemento, iniciando una serie de eventos como la quimiotaxis de células sanguíneas y la exudación de proteínas plasmáticas hasta el sitio infectado o dañado, para la opsonización del agente infeccioso y de las células dañadas.

El complemento es uno de los principales mecanismos de defensa del sistema inmune, como se ha mencionado se activa en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria. Los componentes del complemento pueden ser activados por diferentes vías mediante una cascada de proteínas permitiendo el reconocimiento por parte del sistema inmune del agente infeccioso y la activación de la fagocitosis. La CRP activa la vía clásica del complemento mediante la unión a una de sus proteínas (C1q) y participa en la eliminación de agentes externos (Du Clos 2000; Li et al., 2007).

La sobreexpresión del sistema de coagulación y de cicatrización, también es una característica de la respuesta de fase aguda para mantener la homeostasis y evitar el desequilibrio en el proceso de reparación (Li et al., 2007). PFA como la protrombina y el fibrinógeno, están involucrados en la cascada de coagulación y producen la activación del endotelio incluyendo un incremento de células de adhesión, extensión y proliferación.

En definitiva, la respuesta de fase aguda es un mecanismo homeostático cuya finalidad es recuperar las funciones normales del organismo lo antes posible. Este resultado se obtiene mediante el aislamiento y destrucción de los agentes infecciosos, la eliminación del tejido dañado y la reparación del órgano afectado. Este proceso generalmente revierte en unos pocos días tras la desaparición de la causa que lo provocó; sin embargo, si la causa persiste puede darse una inflamación crónica. La pérdida de este control local o la aparición de una respuesta hiperactiva llevan a una respuesta sistémica conocida como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).

1.2 Proteínas de fase aguda, características bioquímicas y función

Como se ha mencionado anteriormente, durante la respuesta de fase aguda la concentración sérica de las PFA cambia notablemente. Estas proteínas se

pueden clasificar atendiendo al cambio que experimentan en su concentración, como PFAs positivas o negativas. Las PFAs positivas aumentan su concentración y en este grupo se incluyen algunas proteínas séricas bien conocidas, como la proteína C reactiva (CRP), el amiloide A sérico (SAA) y la haptoglobina (Hp). Las PFAs negativas, al contrario, disminuyen su concentración durante la RFA. Se incluyen en este grupo la albúmina, la transferrina (Tf) y la apolipoproteína A-I (Apo A-I).

Las PFAs positivas pueden clasificarse también, según el incremento de concentración que experimentan, como principales, moderadas y minoritarias. Las PFAs principales son aquellas que aumentan su concentración más de 10 veces respecto a las concentraciones basales. Este incremento es muy rápido, ya que aparece antes de las primeras 24 horas tras producirse el estímulo inflamatorio y su vida media es muy corta, de manera que los niveles basales se recuperan rápidamente con la desaparición del estímulo. Otra característica de las PFAs principales es la baja concentración sérica que presentan en situación de normalidad, que en algunos casos está por debajo del umbral de 1 µg/mL. Las PFA moderadas, alcanzan concentraciones entre 2 y 10 veces superiores a los niveles basales y presentan una cinética más lenta. Las concentraciones máximas suelen alcanzarse entre las 48-72 horas después del estímulo y permanecen elevadas durante varios días. Las PFAs minoritarias son aquellas que experimentan menores aumentos en sus concentraciones plasmáticas tras el estímulo inflamatorio, pudiendo aumentar su concentración en un rango entre un 50 y un 100% respecto a los valores basales. Aunque en términos de incrementos las PFAs moderadas aumentan menos que las principales, debido a que su concentración en suero de animales sanos es más elevada, comparando con los niveles basales de CRP o SAA, la cantidad total de proteína producida durante la respuesta de fase aguda es mayor (Ceron et al., 2005; Eckersall et al., 2010).

El interés despertado por las PFAs negativas ha sido mucho más limitado. El que entre ellas aparezca, en prácticamente todas las especies estudiadas, la albúmina, que es la proteína cuantitativamente más importante del suero

sanguíneo, posiblemente haya devaluado el papel de las PFAs negativas. Se cree que el descenso en la síntesis de estas proteínas podría aportar aminoácidos para la producción de las PFAs positivas durante la respuesta sistémica, al menos en las etapas iniciales de la misma. Más adelante, estas necesidades de aminoácidos serían aportadas por la degradación de proteínas del músculo, que es uno de los cambios metabólicos característicos de la RFA (Ceciliani et al., 2002).

Sin embargo, entre las PFAs negativas destaca la Apo A-I, que paradójicamente puede ejercer funciones trascendentales durante la RFA al reducir de manera importante su concentración plasmática. La Apo A-I es el componente proteico mayoritario de las de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en situaciones de normalidad. Diversos estudios han demostrado que la Apo A-I, además de estar implicada en el transporte reverso del colesterol, tiene funciones anti-inflamatorias (Barter et al., 2006), antioxidantes (Barter et al., 2004), vasodilatadoras y es un antiagregante plaquetario (Kawai 1994). Todas estas actividades, sin duda protectoras para el organismo, se ven afectadas durante la RFA, en la que el metabolismo lipídico es drásticamente modificado. Durante la RFA las HDL pierden Apo A-I, que es sustituida por el SAA, que es una PFA positiva principal. La pérdida de Apo A-I disminuye la captación de las HDL por los hepatocitos y a la vez la presencia de SAA en las HDL aumenta la afinidad de estas por los macrófagos, modificando el transporte reverso de colesterol. Además, las HDL se tornan pro-inflamatorias y pro-aterogénicas, ya que pierden también su capacidad de inhibir la oxidación de las LDL. El descenso de la Apo A-I, las modificaciones de las HDL y del metabolismo lipídico en general contribuyen a la defensa del huésped, proporcionando por un lado lípidos para la reparación de los tejidos afectados y energía para las células del sistema inmunitario. En este contexto, el papel de la Apo A-I como PFA negativa no es secundario sino todo lo contrario. En estudios recientes se ha visto que en cerdos sometidos a inflamación o diferentes procesos infecciosos experimentales la concentración de Apo A-I cae a los pocos días del estímulo hasta niveles comprendidos entre un medio y un décimo de sus valores iniciales (Carpintero et al., 2005; Carpintero

2007; Carpintero et al., 2007). La evolución de los niveles de la Apo A-I porcina es similar, aunque contraria, a la de las PFAs positivas principales.

Las PFAs son indicadores altamente sensibles de inflamación, pero carecen de especificidad y su respuesta durante la fase aguda depende de la especie. Existe gran variabilidad en la RFA entre las diferentes especies (Tabla 2), y el que una proteína se comporte como PFA en una especie determinada no significa que lo sea en otra distinta.

Tabla 2. Clasificación de las PFAs según la especie animal

Especie	Principales (10-100 veces)	Moderadas (2-10 veces)	Minoritarias (<2 veces)	Negativas (disminución)
Humano	CRP, SAA	GPA, Fb, Hp, ITIH4	Cp	Albumina, Tf, Apo A-I
Rata	Inhibidor de Cisteín Proteasas, GPA, α_2 -MG	Hp, ITIH4, Fb	α 1-AT, Cp, CRP	Albúmina, Tf, Transtirretina
Cerdo	Pig-MAP, CRP, SAA	Hp, Fb	Cp	Albúmina, Tf, Apo A-I
Vaca	SAA, Hp	ITIH4, GPA, Cp	CRP, Fb	Albúmina
Caballo	SAA	Hp, GPA, Fb, Cp		Albúmina
Gato	SAA, GPA	Hp, Cp, Fb		Albúmina, Tf
Perro	CRP, SAA	Hp, GPA, Cp, Fb		Albúmina, Tf

CRP; proteína C reactiva, SAA; amiloide A sérico, GPA; α_1 -glicoproteína ácida, Fb; fibrinógeno, Hp; haptoglobina, Cp; ceruloplasmina, Tf; transferrina, Apo A-I; apolipoproteína A-I.

Revisado en Petersen et al., 2004; Eckersall et al., 2008; Kjelgaard-Hansen et al., 2011; Gómez-Laguna et al., 2011

En general, en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta el momento, existe un incremento en la síntesis de la haptoglobina (Hp), fibrinógeno (Fb) y α_1 -glicoproteína ácida (GPA), con excepción del cerdo para esta última (Lampreave et al., 1994), y una reducción en la síntesis de la albúmina y la transferrina (a excepción del pollo) durante la RFA. Por el contrario la CRP y SAA muestran grandes diferencias de una especie a otra.

A continuación se describen algunas de las PFAs más relevantes:

Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (CRP) fue la primera PFA identificada en el suero de humanos y primates no humanos (Abernethy et al., 1941). Su presencia en los sueros infectados pudo ponerse en evidencia por ser precipitable por el polisacárido C de las bacterias del género *Pneumococcus*. A esta propiedad debe su nombre de proteína C reactiva (CRP). Es una pentraxina, que consta de cinco subunidades unidas de manera no covalente y combinadas en forma de estructura pentamérica (Thompson et al., 1999). El peso molecular de la CRP humana es de 118 KDa por equilibrio de sedimentación o de 120 KDa derivado de su secuencia de aminoácidos, con subunidades de 24,3 KDa (Volanakis et al., 1978). A diferencia de la mayoría de PFAs la CRP no es una glicoproteína, excepto en la especie canina donde dos de sus cinco subunidades se encuentran glicosiladas (Caspi et al., 1984).

La CRP tiene la capacidad de influir en varias etapas de la inflamación. Una función importante es su capacidad de unirse a fosforilcolina en presencia de Ca^{2+} , pudiendo así reconocer a patógenos extraños así como a fosfolípidos constituyentes de células propias dañadas (Gabay et al., 1999; Thompson et al.,

1999). Los complejos formados por la CRP con células extrañas y dañadas activan la vía clásica del complemento, lo que permite la captación de dichos complejos por los macrófagos gracias a los receptores de CRP presentes en su membrana (Du Clos et al., 2001). De esta manera, la CRP puede iniciar la eliminación de patógenos extraños y también de células propias dañadas, previniendo, en este último caso, los procesos de autoinmunización. Recientemente se ha visto la que la CRP es secretada en su forma pentamérica (pCRP), pero durante la inflamación puede aparecer también en forma monomérica (mCRP) que consta de una única subunidad. Esta última se formaría mediante una disociación irreversible de la pCRP en los sitios de inflamación, daño tisular o infección y serviría, junto con las proteínas C1q y C4bp del complemento, para modular más finamente la activación de la vía clásica del complemento en células necróticas (Sproston et al., 2018). Otros efectos pro-inflamatorios de la CRP incluyen la inducción de citoquinas inflamatorias en monocitos (Ballou et al., 1992b)

En medicina humana, la medida de la CRP es usada como un marcador clínico de inflamación. A pesar de su falta de especificidad, la concentración de CRP refleja la presencia y severidad de los procesos inflamatorios o infecciosos activos (revisado, Pepys 1981). Los niveles encontrados en adultos sanos, suelen ser inferiores a 2 mg/L, aunque niveles hasta 10 mg/L pueden encontrarse en individuos aparentemente sanos. Por encima de 10 mg/L se consideran elevaciones notables. En individuos con inflamación, casi siempre debidas a infecciones severas, pueden observarse niveles de hasta 500 µg/mL (Ballou et al., 1992a). La medida de esta proteína ha sido de utilidad en la detección de enfermedades cardiovasculares, además aumentos significativos de CRP se han asociado a diferentes enfermedades como apendicitis, colecistitis, pancreatitis, meningitis y en diabetes gestacional y preclampsia entre otras (Cao et al., 2018; Sproston et al., 2018).

Al igual que en humanos, la CRP es una PFA principal en perro y su concentración plasmática se ha visto aumentada en diversas patologías que

afectan a esta especie (Eckersall et al., 2010). En el cerdo también se han observado incrementos en la concentración plasmática de CRP como respuesta frente a estímulos inflamatorios de diferente naturaleza, como la inyección con aceite de trementina (Lampreave et al., 1994) o ante infecciones ocasionadas por diferentes microorganismos de manera aislada (Heegaard et al., 1998) o en combinación con otros (Pomorska-Mol et al., 2013). En la especie equina se han encontrado aumentos de CRP tras diferentes procesos inflamatorios (Takiguchi et al., 1990). Por el contrario, la CRP no se considera de fase aguda en la especie bovina (Petersen et al., 2004). Sin embargo, no hay unanimidad respecto a ése comportamiento entre los investigadores, ya que se han descrito incrementos en su concentración durante infecciones normales ocurridas en granjas relacionándose su concentración con el estado de salud de los animales (Lee et al., 2003). En gato, la CRP tampoco experimenta cambios frente a inflamación (Kajikawa et al., 1999).

Haptoglobina

La haptoglobina (Hp) es una glicoproteína de la fracción de las α_2 globulinas del plasma de muchas especies animales. La Hp humana, y la de la mayoría de los animales, estructuralmente está compuesta por dos subunidades α y dos subunidades β formando un dímero de dos cadenas $\alpha\beta$ unidas covalentemente por un puente disulfuro, entre dos residuos Cys¹⁵ de cada cadena α . El gen humano de la Hp está formado por tres alelos estructurales, los productos de dichos alelos son los responsables de la presencia de los tres tipos de Hp presentes en la especie humana (1-1, 1-2, 2-2) de diferente estructura y tamaño (Polticelli et al., 2008). La Hp canina, que presenta similitud con el subtipo 1-1 humano, es un tetrámero formado por dos subunidades $\alpha\beta$ de 47 KDa en las que cada subunidad contiene una cadena α de 18 KDa y una β de 34 KDa. Sin embargo, a diferencia de la Hp humana, los dímeros $\alpha\beta$ no están unidos por puentes disulfuro debido a que la Cys¹⁵ participante en el enlace es sustituida por un residuo Leu (Kumazaki et al., 1992; Mominoki et al., 1995). Otra diferencia con la Hp humana es que la cadena α tiene una secuencia de unión a oligosacáridos y

está glicosilada (Mominoki et al., 1995), a diferencia de la humana que únicamente tiene glicanos unidos a sus cadenas β . El patrón de glicosilación de esta proteína puede variar con enfermedades inflamatorias, autoinmunes y neoplasias (Andersson et al., 2001).

La función biológica de la Hp, a la que debe su nombre otorgado por sus descubridores Polonowsky y Jayle (1983), se asocia a su capacidad para formar complejos estables con la hemoglobina. De esta forma es capaz de controlar la disponibilidad del hemo circulante, impidiendo la pérdidas excesivas de hierro por excreción en la orina (Giblett 1974; Yang et al., 2003). Los complejos Hp-Hemoglobina son reconocidos por receptores específicos CD163, presentes en los macrófagos, y eliminados del organismo mediante fagocitosis lo que reduce el daño oxidativo de la hemólisis (Kristiansen et al., 2001). Otras funciones atribuidas a la Hp son: estimulación de la angiogénesis, inhibición de la catepsina, hemaglutinación viral, modulación de la función de los macrófagos, estimulación de la formación de protaglandina E2, inhibición de la producción de superóxidos y el aumento de la producción de calcio en los neutrófilos (Kohler et al., 1978; Oh et al., 1990; Frohlander et al., 1991).

En el perro la Hp es una PFA moderada y responde frente a diversos estímulos inflamatorios y enfermedades infecciosas. La Hp canina es especialmente sensible al efecto de los glucocorticoides. Valores altos de Hp se han encontrado tras el tratamiento con estos y durante hiperadenocorticoidismo (Eckersall 2008). En otras especies como la porcina, aumentos de esta proteína se han visto asociados con diversos signos clínicos y situaciones inflamatorias (Lampreave et al., 1994; Sorensen et al., 2006; Saco et al., 2016). En caballos se han observado aumentos en los niveles de Hp asociados a la inflamación producida por artritis, tanto en suero como en líquido sinovial (Barrachina et al., 2016). En bovino las concentraciones de Hp en suero son muy bajas (< 20 mg/L), a diferencia de otras especies como perro, gato, caballo y cerdo cuyas concentraciones están un rango de 1 a 2 mg/mL (Eckersall 2008). Esta proteína considerada como PFA principal en el suero bovino, se ha estudiado ampliamente

en suero en el diagnóstico de diferentes enfermedades (Eckersall et al., 2010) y en muestras de leche durante mastitis (Pyorala et al., 2011). La Hp también es proteína de fase aguda en el resto de especies estudiadas, como humano, rata, ratón, conejo, gato (Putnam 1975, Petersen 2004).

α_1 -glicoproteína ácida

La α_1 -glicoproteína ácida (GPA), también conocida como orosomucoide, (Weimer et al., 1950), es quizás la glicoproteína sérica humana mejor caracterizada estructuralmente. En el perro es una glicoproteína de 43 KDa que presenta un alto grado de glicosilación, aproximadamente el 45 % de su peso. Debido a su alto contenido en ácidos siálicos la GPA presenta un bajo punto isoeléctrico, pI muy ácido y numerosas microformas con pI comprendidos entre 2,8 y 3,8. (Dello et al., 1987; Fournier et al., 2000).

Al igual que la albúmina sérica, la proteína fijadora de drogas más importante, la GPA puede unirse y transportar sustancias de origen endógeno o exógeno como heparina, histamina, serotonina y esteroides (Fournier et al., 2000). Esta capacidad de unir drogas le confiere una gran utilidad en aplicaciones terapéuticas. La GPA es considerada un antiinflamatorio e inmunomodulador natural. De esta forma, inhibe la activación de los neutrófilos y aumenta la secreción de receptores antagonistas de la IL-1 por los macrófagos (Fournier et al., 2000). Además, puede ayudar en la eliminación del lipopolisacárido (LPS) uniéndose directamente a él y neutralizando así su toxicidad (Moore et al., 1997). Inhibe también la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos (Itoh 1989) y la actividad de las células NK (Natural Killer) (Okumura et al., 1985). Se ha mostrado también que la actividad inmunomoduladora de la GPA depende de su glicosilación (Hatton et al., 1983). Finalmente, es relevante destacar que en lechones recién nacidos la GPA puede alcanzar concentraciones de casi 13 mg/mL, que disminuyen rápidamente después del nacimiento (Lampreave et al., 1982; Lampreave et al., 1984). Dicha concentración es más de 40 veces superior a la concentración de los adultos normales y representa casi el 50 % de las

proteínas totales del suero de los cerditos recién nacidos. Puede decirse que la GPA desempeña una función desconocida pero sin duda fisiológicamente importante en el periodo fetal y neonatal porcino.

En la mayoría de las especies estudiadas como hombre, rata, ratón (Kushner et al., 1994) GPA es una PFA. En las especies canina y felina GPA se comporta como una PFA positiva moderada. La GPA felina es un reconocido marcador de peritonitis infecciosa y también se han visto niveles elevados en neoplasias (Eckersall et al., 2010). En cerdo por el contrario la GPA no parece comportarse como una proteína de fase aguda, ya que su concentración no se ha visto significativamente modificada significativamente durante la respuesta de fase aguda (Lampreave et al., 1994; Eckersall et al., 1996) aunque recientemente se ha postulado su comportamiento como PFA negativa debido a la disminución de su concentración en el suero de cerdos tras infección experimental con bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas e inflamación aséptica inducida con aceite de trementina (Heegaard et al., 2013)

Amiloide A sérico

El término amiloide A sérico (SAA) comprende a una familia de proteínas polimórficas codificada por múltiples genes (Sipe 1999). Su secuencia está muy conservada en todos los mamíferos, así como en pájaro y otras especies animales. Presenta un número variable de isoformas dependiendo de la especie animal. Los SAA 1 y SAA 2 son PFAs principales, ya que sus concentraciones aumentan hasta 1000 veces durante la inflamación. En leche se ha visto la presencia de una isoforma de esta proteína denominada MAA diferente a la del suero y sintetizada por glándula mamaria en vacas con mastitis (Eckersall 2008). Por el contrario, la SAA 4 es inducida mínimamente durante la RFA y solo se ha encontrado en humanos y en ratones. Aunque SAA es una proteína pequeña y su secuencia y polimorfismos son conocidos los detalles de su estructura tridimensional son imprecisos debido a su carácter hidrofóbico (Sack 2018).

Las SAAs son pequeñas apolipoproteínas de 12-14 KDa que se asocian rápidamente durante la RFA con la fracción de las HDL3 en las que se hacen mayoritarias, excediendo en cantidad a la Apo A-I. Esto modifica drásticamente el metabolismo del colesterol. El SAA aumenta la afinidad de las HDL3 por los macrófagos a la vez que disminuye la afinidad de las HDLs por los hepatocitos (Kisilevsky et al., 1992). Entonces, las HDLs se desplazan a los macrófagos que engullen el colesterol y los restos de lípidos en los sitios de necrosis. El colesterol podría entonces ser redistribuido para usarlo en la reparación del tejido y el exceso sería excretado (Steel and Whitehead, 1994). Además, se le han atribuido otras funciones, como la inducción de enzimas que degradan la matriz extracelular y reclutamiento quimiotáctico de células inflamatorias a los sitios de inflamación (Ye et al., 2015). El SAA 1 está potencialmente involucrado en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas: es el precursor de la proteína amiloide A depositada la amiloidosis y también ha sido implicada en la patogénesis de la aterosclerosis y la artritis reumatoide (Ceron et al., 2005; Eckersall 2008).

El SAA se comporta como PFA principal en la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas (Petersen et al., 2004; Ceron et al., 2005), excepto en la rata (Kushner 1988). El SAA junto con la CRP son las principales PFAs en el perro. La determinación de SAA es útil en gatos donde actúa como principal PFA frente a una amplia variedad de procesos inflamatorios e infecciosos (Eckersall et al., 2010). En vaca, aumentos en la concentración de SAA se han asociado a infecciones tanto naturales como experimentales, y junto con Hp, el SAA ha sido propuesto como biomarcador de la mastitis (Eckersall et al., 2010). Elevadas concentraciones de SAA se han encontrado en el suero de caballos sometidos a inflamación experimental (revisado en (Eckersall 2008)), además esta proteína ha sido usada para diferenciar casos infecciosos como enteritis, enterocolitis, peritonitis, o abscesos abdominales, de casos no infecciosos que causan dolor abdominal (Vandenplas et al., 2005). En humanos SAA muestra una sensibilidad y rapidez de respuesta similar a la que presenta CRP. Niveles elevados de esta proteína se han encontrado asociados a etapas tempranas de diversos tipos de

cáncer, lo que ha llevado a evaluar su papel como posible biomarcador en este tipo de patologías; además debido a su carácter lipofílico los cambios en la concentración de SAA se han asociado a cambios en la formación de HDL y a lesiones ateroscleróticas, así como también se ha visto asociada a sarcoidosis (Revisado en (Sack 2018)).

Cadena pesada 4 del inhibidor de tripsina inter- α

La cadena pesada 4 del inhibidor de tripsina inter- α (ITI_{H4}) es una glicoproteína sérica, que se incluye dentro de la familia del inhibidor de tripsina inter- α (ITI), dada su homología secuencial con el resto de cadenas pesadas de esta superfamilia. La familia ITI consta de una serie de proteínas plasmáticas que resultan de la unión de una cadena ligera (bikunina) y diferentes cadenas pesadas, que se unen a través de puentes de glicosaminoglicanos (Salier et al., 1996). La familia de las cadenas pesadas consta de 5 miembros: H1, H2, H3, H4 y la última caracterizada, la H5 (Himmelfarb et al., 2004). La bikunina se encuentra unida a las cadenas H1, H2, H3 y H5, pero no a la H4. La falta de bikunina, que contiene dos dominios inhibidores de la tripsina tipo kunitz, hace que la ITI_{H4}, a diferencia del resto de miembros de su familia, no posea capacidad inhibitoria de la tripsina (Gonzalez-Ramon et al., 1995).

Inicialmente, bajo el nombre de sgp120 (serum glicoprotein 120 KDa), la ITI_{H4} humana fue clasificada como una proteína reguladora del complemento (Hammer et al., 1989). Casi al mismo tiempo y de manera independiente, dos grupos japoneses dedujeron la secuencia de 902 aminoácidos para la proteína madura a partir de la secuencia de cDNA (Nishimura et al., 1995; Saguchi et al., 1995). Debido a que esta proteína es sensible a la degradación mediante la calicreína, algunos autores pasaron a denominarle PK-120 (human plasma kallikrein-sensitive protein de 120 KDa) (Nishimura et al., 1995; Pu et al., 1995), mientras que otros la renombraron como IHRP (ITI heavy chain related protein) (Choi-Miura et al., 1995; Saguchi et al., 1995), debido a la homología que presentaba con las cadenas pesadas de familia ITI. Poco antes de llevarse a cabo

estos estudios, la ITIH4 fue descrita como PFA por primera vez en la especie porcina, a la que se le denominó en origen Pig-MAP (major acute phase protein in pigs); esta nueva proteína porcina experimentaba los mayores aumentos de concentración en el suero, tras la inducción de la fase aguda mediante la inyección con aceite de trementina (Lampreave et al., 1994). Posteriormente esta nueva proteína porcina fue identificada como una proteína homóloga a la PK-120 humana, mostrando una homología de 85 % en la secuencia amino terminal (Gonzalez-Ramon et al., 1995). Esta proteína plasmática pasó a denominarse ITIH4 (Salier et al., 1996), aunque el término Pig-MAP es comúnmente utilizado para denominar a esta proteína en el cerdo.

Gracias a los estudios de Saguchi y Nishimura, se conoce la secuencia de la ITIH4 humana. El codón de iniciación ATG en el cDNA de esta ITIH4 está flanqueado por una secuencia consenso de tipo Kozak (CCACCATGG), habitual en eucariotas superiores (Saguchi et al., 1995). La proteína se sintetiza en forma de precursor con un péptido señal de 28 aminoácidos. La proteína madura contiene cuatro sitios de glicosilación (Asn⁵³, Asn¹⁷⁹, Asn⁴⁸⁹, Asn⁵⁴⁹), tres residuos de cisteína (Cys³⁸⁶, Cys⁷¹⁹ y Cys⁸⁷⁹) y tres sitios de reconocimiento de la calicreína (Arg⁴⁵⁵, Arg⁶³³, Arg⁶⁶⁰) dentro de la secuencia (Phe-Arg-Xaa) (Nishimura et al., 1995, Saguchi et al., 1995). Debido a la acción de la calicreína, en primer lugar se obtienen dos fragmentos, uno de 100 KDa y otro de 35 KDa, seguidamente el fragmento de 35 KDa pasa a 70 KDa y un fragmento teórico de 30 KDa que no se ha encontrado (Pu et al., 1995). Los dos residuos Cys⁷¹⁹, Cys⁸⁷⁹ se encuentran en el fragmento de 35 KDa formando un puente disulfuro.

La similitud entre ITIH4 y las cadenas pesadas de la familia ITI, está restringida a los primeros dos tercios de la secuencia amino terminal. En esta región tanto la ITIH4 como las otras cadenas pesadas poseen motivos secuenciales de interés, entre los que se encuentran un dominio Vault, un sitio de unión calcio y un dominio Von Willebrand. La región carboxilo terminal (el último tercio de la secuencia) presenta homología con proteasas dependientes de ATP (Saguchi et al., 1995).

La ITIH4/Pig-MAP se ha estudiado ampliamente en la especie porcina, donde es caracterizada como principal proteína de fase aguda (Lampreave et al., 1994; Heegaard et al., 1998). Su concentración aumenta en infecciones producidas tanto por virus, como por bacterias o parásitos (Carpintero et al., 2007; Martin De La Fuente et al., 2010; Pomorska-Mol et al., 2013). La Pig-MAP también se ha visto elevada en situaciones de estrés y que comprometen al bienestar animal como el transporte (Piñeiro et al., 2007b), el hacinamiento (Marco-Ramell et al., 2011) o cambios en las pautas de alimentación (Piñeiro et al., 2007a).

En el caso humano, aumentos de esta proteína han sido descritos en pacientes tras diferentes procesos inflamatorios como infarto de miocardio, angina de pecho o tras intervenciones quirúrgicas, lo que permitió caracterizarla como una PFA en esta especie (Piñeiro et al., 1999). En la especie bovina también actúa como tal y se ha visto incrementos significativos de esta proteína tanto en suero (Piñeiro et al., 2004), como en leche (Alonso-Fauste et al., 2012; Soler et al., 2018) de vacas afectadas por mastitis. En otras especies como oveja (Sendino 1988), rata (Daveau et al., 1998) o ratón (Duan et al., 2005) también se ha observado que esta proteína actúe como PFA positiva. Hasta el inicio de esta tesis no se tenían conocimientos acerca del comportamiento de la ITIH4 canina en fase aguda. Resultados sobre esta proteína y su implicación como PFA serán discutidos en este trabajo.

Aunque su estructura y su implicación en la fase aguda son conocidas, la función biológica de la ITIH4 se desconoce todavía. Un posible papel podría estar relacionado con la regulación de la migración celular y la proliferación durante el desarrollo de la RFA, ya que uno de sus dominios (el dominio von Willebrand A) está implicado en la interacción con moléculas de la matriz extracelular (ECM), como el colágeno, proteoglicanos o heparina (Salier et al., 1996). También se ha descrito que inhibe la polimerización de la actina y la fagocitosis en células polimorfonucleares (Choi-Miura et al., 2000) y parece estar implicada tanto el desarrollo como en la regeneración hepática (Bhanumathy et al., 2002).

En humanos, la ITIH4 se ha propuesto como marcador de diferentes patologías como esclerosis lateral amiotrófica (Tanaka et al., 2013), o daño isquémico (Nayak et al., 2016). Resultados previos (Tang et al., 2008), mostraron que la ITIH4 se encuentra aumentada en el carcinoma hepatocelular humano y la ruta de señalización de IL-6 sobreactivada, sugiriendo un papel pro-tumoral de esta proteína. Recientes estudios la consideran como un marcador temprano y de diagnóstico para dicho cáncer (Li et al., 2018). En adenocarcinoma gástrico su uso como biomarcador también ha sido considerado (Subbannayya et al., 2015). Además de los cambios en su concentración, la presencia de fragmentos de ITIH4 en diferentes tipos de cáncer también ha sugerido el empleo de esta proteína como marcador temprano y específico de patologías tumorales. El péptido de 35 KDa se ha propuesto como marcador específico de carcinoma de glándula mamaria y de ovario, por verse aumentado en este tipo de cánceres y no en otros como osteosarcoma o carcinoma nasofaríngeo (Mohamed et al., 2008).

1.3 Proteínas de fase aguda como biomarcadores en medicina canina

El creciente interés en el uso de las PFAs en medicina canina es una muestra de las amplias posibilidades de aplicación de estas proteínas como biomarcadores en diversas áreas (Eckersall et al., 2010). La sensibilidad y especificidad del análisis de estas proteínas para la detección de procesos inflamatorios es superior a la que proporcionan otros parámetros inespecíficos de inflamación, como el ratio albúmina/globulina o el recuento de leucocitos. Además las PFA pueden utilizarse para detectar inflamación en animales en los que la médula ósea no puede responder al estímulo inflamatorio, como en casos de tratamientos con quimioterapia y leucemia. Cabe destacar que las PFA son más estables que los componentes celulares de la sangre, por lo que los ensayos pueden realizarse en muestras congeladas (Ceron et al., 2005).

Tabla 3. Ejemplos de patologías caninas en las que se han evaluado las PFA.

Patología	PFA	Referencias
Enfermedades inflamatorias		
Anemia hemolítica autoinmune	CRP, GPA, albúmina	Mitchell et al., 2009
Poliartritis inmunomediada	CRP	Kjelgaard-Hansen et al., 2006; Ohno et al., 2006
Pancreatitis	CRP	Holm et al., 2004; Hori et al., 2006; Sato et al., 2017
SIRS	CRP, albúmina	Gebhardt et al., 2009; Torrente et al., 2015; Gommeren et al., 2018
Infecciones bacterianas		
Piometra	CRP, SAA Hp	Dabrowski et al., 2007; 2013; Jiptean et al., 2014
Escherichia coli	CRP, Hp	Tvarijonaviciute et al., 2011
Leptospirosis	CRP, Hp	Caspi et al., Yamamoto, Mastroilli et al., 2007
Infecciones parasitarias		
Leishmaniasis	CRP, Hp	Martinez-Subiela et al., 2002; 2011
Babesiosis	CRP, GPA	Matijatko et al., 2002; Lobetti et al., 2000
Espirocercosis	CRP, Hp	Mylonakis et al., 2012
Infecciones virales		
Parvovirus	CRP, SAA, GPA	Yamamoto et al., ; Yule et al.,
Neoplasias		
Mamarias	Hp, CRP	Panellas et al., 2009
Linfoma	CRP, Hp	Merlo et al., 2007, 2008; Mischke et al., 2007; Nielsen et al., 2007
Sarcomas y mastocitomas	CRP, GPA, HP	Chase et al., 2012

Otros

Lesión en mucosa gástrica	CRP, SAA, Hp, Fb	Bayrami and Ulutas, 2008
Problemas en cicatrización	CRP	Knapp et al ., 2009
Enfermedad cardiaca	CRP	Rush et al., 2006, Saunders et al., 2009
Hiperadenocorticismo	CRP, Hp, Fb, albúmina	McGrotty et al., 2005; Caldin et al ., 2009

El cambio en la concentración de los niveles plasmáticos de las PFAs se ha determinado en diversas patologías que afectan a la especie canina, tal y como puede verse en la Tabla 3. El abanico de patologías estudiadas es muy amplio. No obstante, no todas las patologías muestran los mismos incrementos en las mismas PFAs, y el aumento y la prevalencia de estos viene influida por el tipo del estímulo.

En medicina canina las PFA resultan útiles como marcadores de inflamación complementarios a los marcadores tradicionales, como es el recuento de células blancas (Nakamura et al., 2008), o pueden ayudar en el diagnóstico de enfermedades específicas, como pancreatitis (Mansfield et al., 2008), enfermedades intestinales inflamatorias (Jergens 2004) y meningitis sensible a corticoides (Bathen-Noethen et al., 2008; Lowrie et al., 2009a; Lowrie et al., 2009b) En el caso de la meningitis sensible a corticoides, cuyo diagnóstico basado únicamente en criterios clínicos y test de laboratorios no específicos no ha sido satisfactorio, se han realizado estudios que demuestran un incremento de CRP, SAA y Hp en perros que presentaban una fase inicial de la enfermedad (Eckersall et al., 2010).

El valor pronóstico de las PFAs para predecir el curso de enfermedades agudas es otro posible campo de aplicación de estos biomarcadores, de indudable interés. Varios estudios han evaluado la medida de la CRP con esa finalidad en perros con anemia hemolítica autoinmune (Griebsch et al., 2009; Mitchell et al., 2009), en perros en estado crítico que ingresaron en unidades de

cuidados intensivos, o en perros con SIRS (Chan et al., 2009; Gebhardt et al., 2009). Aunque el valor de la CRP determinado en el momento de ingreso del animal no mostró un claro valor pronóstico, la determinación de CRP si resultó relevante para evaluar con prontitud la evolución de la enfermedad tras el inicio el tratamiento. En perros con SIRS o pancreatitis, la no disminución de la concentración de CRP después del tratamiento pareció ser relevante para la no supervivencia del animal (Mansfield et al., 2008; Gebhardt et al., 2009).

Las PFAs CRP, Hp y SAA han mostrado igualmente su valor en el seguimiento del periodo postoperatorio y sus posibles complicaciones en perras afectadas por piometra y sometidas a cirugía. (Dabrowski et al., 2009). También se ha observado una relación entre la evolución de los niveles de las PFA y el resultado de los tratamientos en pacientes con neoplasias o enfermedades hematológicas (Tecles et al., 2005). En el caso concreto de anemia hemolítica autoinmune Hp, CRP y SAA mostraron pequeños o moderados incrementos en su concentración, siendo más notables en este caso los incrementos observados para la Cp (Tecles et al., 2005). Se ha mostrado el potencial de CRP y Cp durante la monitorización de la respuesta al tratamiento en animales infectados con *L. infantum* Además se ha sugerido un papel importante de la CRP en la detección de posibles recaídas tras la suspensión del tratamiento (Martinez-Subiela et al., 2003; Sasanelli et al., 2007; Martinez-Subiela et al., 2011b). Así mismo se ha visto la utilidad de la determinación de CRP y SAA para evaluar la eficacia de los tratamientos a antibióticos en animales infectados con neumonía bacteriana (Viitanen et al., 2017).

1.4 Métodos analíticos para la determinación de PFAs en especie canina

Los inmunoensayos son las técnicas más utilizadas para la cuantificación individual de las proteínas séricas. Estas técnicas requieren la disponibilidad de un antisuero o anticuerpo específico, capaz de precipitar o fijar a la proteína de interés. La existencia de reacciones cruzadas entre un antisuero o anticuerpo

preparado frente a una proteína de una especie determinada y las proteínas homólogas de otras especies, ha permitido, en algunos casos, aplicar un mismo método analítico a diferentes especies. Hay varias formas en las que los anticuerpos se han incorporado en los inmunoensayos permitiendo el desarrollo de diferentes metodologías para la cuantificación de PFA caninas, entre las que se encuentran la inmunodifusión radial (IR), la inmunoturbidimetría (IT), el ELISA, la inmunocromatografía o la inmunofluorimetría.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de las PFAs caninas, algunos de los cuales han sido comercializados. En la Tabla 4 se recogen los principales métodos comerciales cuya validación está disponible en la literatura. En los últimos años se han puesto en el mercado diferentes métodos turbidimétricos para la determinación de CRP canina. Estos métodos suponen una buena elección para el laboratorio clínico, debido a la capacidad de automatizarse utilizando un analizador de bioquímica clínica, y a la baja imprecisión que presentan.

La CRP, es una de las principales PFA en el perro, además, debido a sus características fisicoquímicas es fácil de purificar, es por esto por lo que es la PFA para la que más métodos de medida validados se encuentran en el mercado. La CRP canina se determinó inicialmente mediante métodos “in house” utilizando técnicas de inmunoprecipitación (Caspi et al., 1984), ELISA (Eckersall et al., 1989) o turbidimetría (Eckersall et al., 1991). El primer ELISA comercial específico de especie, permitió extender este análisis a diferentes laboratorios, sin embargo la alta imprecisión entre ensayos no lo hace adecuado para diagnóstico (Kjelgaard-Hansen et al., 2003b). La validación en perro de un ensayo inmunoturbidimétrico específico para CRP humana (Kjelgaard-Hansen et al., 2003a), proporcionó una herramienta de medida automatizable para la determinación de CRP canina, con una menor imprecisión, aunque con error a bajas concentraciones.

El uso de métodos de cuantificación de PFAs desarrollados en otras especies y validados para perro ha sido frecuente hasta ahora, pero hay que tener

en cuenta que un requisito imprescindible para garantizar la veracidad de los métodos es el uso de estándares y calibradores específicos de especie. Además en el caso de utilizar anticuerpos policlonales desarrollados frente a otra especie, hay que validar cada nuevo lote de anticuerpos, porque puede que no reconozcan de la misma manera a las proteínas (Kjelgaard-Hansen et al., 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, en los últimos años se han introducido en el mercado varios métodos turbidimétricos específicos de la especie canina, que permiten determinar la CRP con alta precisión y exactitud (Hillstrom et al., 2014) (Piñeiro et al., 2018). Igualmente se han desarrollado diferentes metodologías “point of care” que permiten la obtención de resultados de forma rápida en la clínica (Mcgrotty et al., 2004; Jasensky et al., 2015). También se ha desarrollado un método de alta sensibilidad basado en técnicas inmunofluorimétricas, que permite cuantificar la CRP en otras matrices como orina (Martinez-Subiela et al., 2013) o fluido cerebroespinal (Martinez-Subiela et al., 2011a) entre otros.

A diferencia de la CRP, para la cuantificación de SAA canina la disponibilidad de métodos es mucho más limitada. El método más utilizado para la determinación de esta proteína es un ELISA tipo sándwich desarrollado con anticuerpos monoclonales anti SAA humanos y validado para la especie canina (Martinez-Subiela et al., 2005). También se ha encontrado en la literatura la validación de un ensayo inmunturbidimétrico para diferentes especies, entre las que se incluyen perro, gato y caballo, que utiliza anticuerpos monoclonales anti SAA humano (Christensen et al., 2012)

Tabla 4. Métodos analíticos comerciales validados en la literatura, para la determinación de las principales PFAs en perro.

PFA	Tipo de ensayo	Referencia comercial	Especificidad	Validación
CRP	ELISA tipo sándwich	PHASE Canine CRP Assay kit, Tridelta	Perro	Kjelgaard-Hansen 2003 a
CRP	Inmunoturbidimétrico	Bayer	Humano	Kjelgaard-Hansen 2003
CRP	Inmunoturbidimétrico	Gentian canine CRP	Perro	Hillström 2014; Kjelgaard-Hansen 2014
CRP	Inmunoturbidimétrico	Turbovet canine CRP, Acuvet Biotech	Perro	Piñeiro et al., 2018
CRP	Point of care	LifeAssays canine CRP	Perro	Ibraimi et al., 2013
CRP	Point of care	EUROLYSER Diagnostical	Perro	Jasensky et al., 2015
Hp	Espectrofotométrico	PHASE Haptoglobin Assay kit, Tridelta	Multiespecies	Martinez-Subiela 2005
Hp	Inmunoturbidimétrico	Izasa	Humano	Tecles 2006
SAA	ELISA sandwich	Tridelta	Multiespecies	Martinez-Subiela 2005

En el caso de la Hp el método de cuantificación más ampliamente utilizado es un método espectrofotométrico basado en la medida de la actividad peroxidasa del complejo Hp-hemoglobina (Eckersall et al., 1999). Al no ser un inmunoensayo no requiere la utilización de anticuerpos específicos y por tanto se considera un método multiespecie, aunque esto no lo exime de una correcta validación para cada especie. En la literatura se ha encontrado su validación para la determinación de Hp canina (Martinez-Subiela et al., 2005). Uno de los principales problemas que presenta este método es la alta interferencia de la hemólisis en la

medida. Este problema también se ha encontrado en el ensayo inmunturbidimétrico desarrollado para la Hp humana y validado para la Hp canina (Tecles et al., 2007).

1.5 Piometra canina

La piometra es la afección más común en perras que han alcanzado la madurez sexual y que se manifiesta mediante acumulación de pus en el útero. Se trata de una enfermedad grave que puede suponer una amenaza para la vida. Generalmente, afecta a perras de mediana edad, aunque también puede manifestarse en perras jóvenes desde el cuarto mes de edad, a partir del primer celo. Las perras más susceptibles son aquellas que nunca han procreado (Dabrowski et al., 2007; Hagman 2018).

Se trata de una infección secundaria, no contagiosa, ocasionada por una infección bacteriana oportunista que viene favorecida por el aumento de progesterona y por los cambios morfológicos del endometrio tras el periodo de celo. *E. coli* es el patógeno que con mayor frecuencia se ha aislado del útero en piometra, aunque también se han encontrado otros organismos como *Staphilococcus sp* o *Streptococcus sp* entre otros. Como respuesta a los niveles de secreción de progesterona que se producen después del celo, puede darse un aumento del grosor de la pared del endometrio y la aparición de quistes (hiperplasia endometrial quística, HEQ). Además la progesterona disminuye la contractilidad del útero y aumenta la secreción de moco, facilitando el cierre del cuello del útero. Este ambiente genera unas condiciones favorables para el crecimiento bacteriano. Aunque la HEQ es un factor de predisposición, piometra y HEQ pueden desarrollarse de manera independiente (Hagman 2018)

El cierre del cérvix es un factor determinante en la gravedad de la enfermedad. Si este permanece abierto las secreciones producidas por la infección pueden ser expulsadas. En cambio si se obstruye completamente, debido a la aparición de quistes en el endometrio, al no poder producirse la

descarga vaginal las secreciones se acumulan dando lugar a una inflamación en el útero, que se conoce como piometra cerrada. Se trata de una situación aguda que evoluciona rápidamente a estado de gravedad.

1.5.1 Diagnóstico y tratamiento de la piometra canina

Además de la acumulación de pus en el útero, la piometra se caracteriza por una serie de manifestaciones clínicas y patológicas tanto a nivel local como sistémico, causadas principalmente por las bacterias y sus productos bacterianos. La piometra se ha asociado con endotoxemia y sepsis, aunque un diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado facilitan la supervivencia. Además de la descarga vaginal purulenta, que solo se produce en los casos de piometra abierta, entre los síntomas clásicos de piometra canina se incluyen anorexia, depresión o letargia, polidipsia (necesidad exagerada de beber), poliuria, taquicardia, taquipnea, pulso débil y color anormal en las membranas mucosas. Síntomas como fiebre, anorexia, deshidratación, vómitos, diarrea y dolor abdominal están presentes entre el 15 % al 30 % de las perras con piometra (Hagman 2018).

La piometra es fácilmente diagnosticable en su versión clásica (piometra abierta), pero no lo es tanto en los casos en los que no se produce descarga vaginal (piometra cerrada). El diagnóstico de piometra ha de incluir un diagnóstico preliminar basado en la historia, un examen físico y ginecológico en búsqueda de los signos clínicos de la enfermedad así como test para determinar parámetros bioquímicos y hematológicos y un diagnóstico de imagen del abdomen.

La ovariectomía es el tratamiento más seguro y efectivo en la piometra canina, ya que se elimina la fuente de infección y por tanto su posible recurrencia. Además la ovariectomía se utiliza como método de esterilización quirúrgica de elección y como método de prevención. En el postoperatorio es importante controlar los signos de infección ya que una piometra avanzada junto con un largo periodo de hospitalización puede derivar en peritonitis (Jitpean et al., 2014c). Se ha evaluado la posibilidad de un tratamiento puramente farmacológico para el tratamiento de piometra, pero esta opción solo puede administrarse en

piometra abierta y tras una cuidadosa selección del paciente canino (Fieni et al., 2014).

La determinación de variables inflamatorias y su seguimiento puede ser útil para la detección temprana de complicaciones y la detección del progreso de la inflamación sistémica. La determinación de los niveles de CRP, SAA y Hp se ha utilizado en la monitorización del paciente tras la ovariectomía. La concentración de las PFAs disminuye de forma gradual tras la cirugía (Dabrowski et al., 2007), mientras que el aumento o la no disminución en los valores de estas pueden indicar complicación tras la cirugía (Dabrowski et al., 2009). Los niveles de estas PFAs, han sido evaluados también para el diagnóstico de piometra, mostrando variaciones en su concentración en cuanto al tipo y la gravedad de la enfermedad (Dabrowski et al., 2013). En casos que cursan con sepsis se ha visto una importante elevación de los niveles de CRP y SAA (Fransson et al., 2007; Jitpean et al., 2014b).

1.6 Leishmaniosis canina

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria grave ocasionada por protozoos de las diferentes especies del género *Leishmania*. Se trata de una zoonosis que afecta a diferentes especies animales, incluido el hombre. Se considera una de las enfermedades parasitarias más importantes después de la malaria y la filariasis linfática. El género *Leishmania* cuenta con más de 20 especies dando lugar a las diferentes formas clínicas de la enfermedad, entre ellas, la Leishmaniosis visceral canina (Lcan), la forma más grave de la enfermedad, que está causada por el protozoo *Leishmania infantum* (WHO, 2017).

Los primeros casos de *L. infantum* en perros se descubrieron en 1908, por Nicolle y Comte, en Túnez (Rioux et al., 1980). Desde entonces se han identificado varias especies de *Leishmania* en perros de distintas partes del mundo, Africa, Asia y Europa (Viejo Mundo) y América (Nuevo Mundo). Hoy en

día se acepta que el agente causal de la Lcan en el Viejo Mundo, *L. infantum*, y su homólogo en el Nuevo Mundo, *L. chagasi*, son la misma especie (Mauricio et al., 2000).

La leishmaniosis se encuentra en regiones tropicales y subtropicales, es endémica en 98 países y se estima una incidencia de dos millones de casos nuevos al año, de los cuales 500.000 se deben a Lcan (WHO, 2017). La infección por *L. infantum* en perros es endémica en más de 70 países del mundo, aunque se desconoce la prevalencia global en perros domésticos. Lcan es endémica en todos los países de la cuenca mediterránea, incluyendo Portugal, España, Francia, Italia, Grecia, Croacia, Albania, Malta, Chipre y Turquía (Dujardin et al., 2008; Schallig et al., 2013). En todas estas regiones, el perro es el principal reservorio para la infección con *L. infantum*, tanto en perros como en humanos.

1.6.1 Ciclo de vida del parásito

El ciclo natural de la infección por *Leishmania* implica además del protozoo un hospedador vertebrado (hombre o perro) y un vector. Los únicos vectores capaces de transmitir *Leishmania* son las hembras de los flebótomos, insectos voladores de dos alas, que miden entre 2 y 3 mm de longitud. Es importante la presencia de estos ya que la transmisión sostenida de *Leishmania* spp no suele ocurrir en ausencia de vectores.

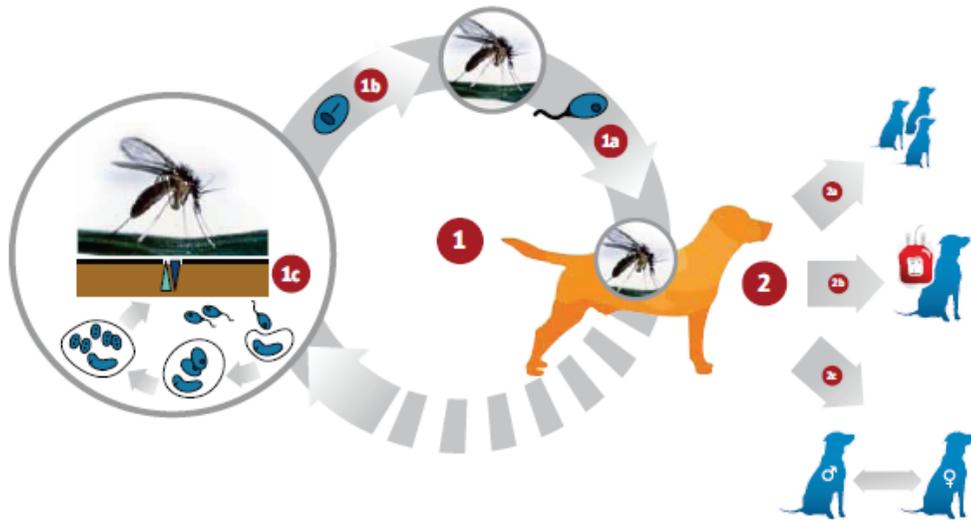
Leishmania tiene un ciclo de vida dimórfico. En estado extracelular se encuentra alojado en el tracto digestivo del flebótomo en forma de promastigote (Figura 2, 1a), en este estado presenta un cuerpo alargado (tamaño, 15-24 μm x 2-4 μm) y un único flagelo, este estado supone la forma infectiva para el hospedador vertebrado. En estado intracelular, dentro del hospedador, se encuentra como amastigote presentándose de forma redondeada con un tamaño de 2-3 μm y sin flagelo (Figura 2, 1b).

La hembra del flebótomo al alimentarse de un animal vertebrado le inocula formas infectivas del parásito (Figura 2, 1c). Dentro de los macrófagos del

hospedador, el parásito en forma de amastigote es englobado por una vacuola parasitófora para eliminarlo, pero *Leishmania* evade las reacciones inmunológicas inespecíficas del huésped sobreviviendo y multiplicándose por fisión binaria. La infección se extiende cuando las células parasitadas se rompen y liberan los amastigotes, que serán fagocitados por más macrófagos donde continuarán multiplicándose. Además esta infección se extiende cuando los macrófagos infectados después de dividirse se diseminan a través de la piel o el torrente sanguíneo a órganos ricos en células macrófagicas como los linfonodos, la médula ósea, el hígado y el bazo (Solano-Gallego et al., 2011).

Los parásitos que se encuentran dentro del hospedador pueden volver al tracto digestivo del flebótomo mediante la picadura de este, lugar donde el parásito madura y vuelve a hacerse infeccioso, listo para repetir el ciclo. Durante la alimentación del flebótomo, las formas no infectivas del parásito se alojan en la parte posterior del intestino medio, ahí maduran durante 1-2 semanas resultando la infección transmisible con promastigotes metaclíclicos localizados en la parte anterior del intestino (Moody et al., 1993).

Se han descrito otras formas de transmisión de *Leishmania* en la que no se encuentra implicado el flebótomo (Figura 2, 2), como la transmisión vertical, la transmisión mediante transfusiones de sangre de donante que contengan el parásito y también se ha descrito la transmisión venérea.



Solano-Gallego et al., 2011, Parasites & Vectors

Figura 2. Ciclo de vida de *L. infantum* y formas de transmisión sin vector. 1, representa el ciclo de vida clásico de *L. infantum*; 1a, promastigote; 1b, amastigote; 1c, diseminación del parásito. 2, formas de transmisión en ausencia de vector: vertical (2a), transfusión sanguínea (2b) y transmisión venérea (2c).

1.6.2 Sintomatología y diagnóstico

Lcan cursa con un amplio abanico de signos clínicos. El cuadro clínico es variable y está condicionado por la capacidad de protozoo para multiplicarse dentro de las células del hospedador, así como de su habilidad para evadir la respuesta inmunitaria, además de los numerosos mecanismos patogénicos existentes en la enfermedad, los diferentes órganos afectados y la individualidad de la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador (Baneth et al., 2008).

Desde la piel los parásitos se distribuyen por la sangre o la linfa a los nodos linfáticos, al bazo y de ahí a otros órganos como hígado y riñones (Alvar et al., 2004). La linfadenomegalia y la esplenomegalia son signos frecuentes en esta enfermedad, el bazo se considera órgano clave para la supervivencia del parásito, ya que su respuesta inmune es ineficaz ante la infección. Las lesiones cutáneas entre las que se encuentran diferentes tipos de dermatitis, úlceras alopecias y onicogriposis, son las manifestaciones clínicas comunes. Otras manifestaciones

clínicas asociadas son las lesiones oculares (conjuntivitis y uveítis), pudiendo ser estas últimas la única manifestación clínica. Atrofia muscular, epistaxis, presencia de mucosas anémicas, hepatomegalia y daño renal, son otros síntomas a tener en cuenta (Baneth et al., 2008).

El diagnóstico de la enfermedad no es sencillo, se recomienda una combinación de examen clínico-patológico con una confirmación de la enfermedad mediante diversas técnicas, tanto serológicas como moleculares.

- Diagnóstico clínico. Consta de un examen físico completo que incluya examen dermatológico, oftalmológico y pruebas de rutina del laboratorio.
- Diagnóstico parasitológico, para determinar la presencia del parásito, puede realizarse mediante diferentes técnicas, como histología e inmunohistoquímica, observación directa mediante microscopio a partir de frotis teñidos, o aislamiento de la especie mediante cultivo.
- Diagnóstico serológico. Se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos contra el parásito en el suero del hospedador. Entre las técnicas cuantitativas encontramos la inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica de aglutinación directa (DAT) y ELISA.
- Diagnóstico molecular. La detección de DNA de Leishmania por PCR, proporciona un diagnóstico sensible y específico de la infección. EL DNA de Leishmania puede extraerse de diferentes tejidos, sangre o fluidos biológicos.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI), se considera el método de referencia para el diagnóstico serológico en la leishmaniosis clínica, debido a su alta especificidad y sensibilidad, aunque parece ser menos sensible en la detección de

infecciones subclínicas (Maia et al., 2008). Debido a que muchos laboratorios han establecido el punto de corte de manera arbitraria, es posible encontrar diferentes titulaciones a la hora de considerar positivo a un animal, desde 1:40 a 1:80 e incluso 1:160 (Gramiccia 2011). Es importante subrayar que para un diagnóstico correcto, la información proporcionada tanto por la evaluación clínicopatológica, como serológica y los datos de PCR, debe ser tratada en conjunto (Solano-Gallego et al., 2011)

En los últimos años se han realizado diversos estudios con perros infectados tanto de manera natural como experimental con *L. infantum*, para evaluar si la medida de las PFAs podrían ayudar en el diagnóstico de la enfermedad y/o en su monitorización. (Martinez-Subiela et al., 2002; Sasanelli et al., 2007; Martinez-Subiela et al., 2011b; Martinez-Subiela et al., 2014)

1.7 Proteínas de fase aguda como marcadores de bienestar animal

El termino bienestar animal hace referencia al estado físico y mental de un animal en relación a las condiciones en las que vive y muere. Para evaluar el bienestar animal se pueden plantear preguntas tales como:

- ¿El animal muestra signos de sufrimiento o dolor?
- ¿El animal está sano y tiene lo que quiere?
- ¿El ambiente del animal cumple el principio de las cinco libertades (libertad de no tener hambre ni sed; libertad de confort; libertad de ausencia de dolor, lesiones y enfermedad; libertad de ausencia de miedo y distrés; libertad de expresar un comportamiento normal)? (Farm Animal Welfare Council, 1992)

La Organización Mundial de la Salud Animal considera que un animal se encuentra en un estado satisfactorio de bienestar cuanto está sano, confortable y

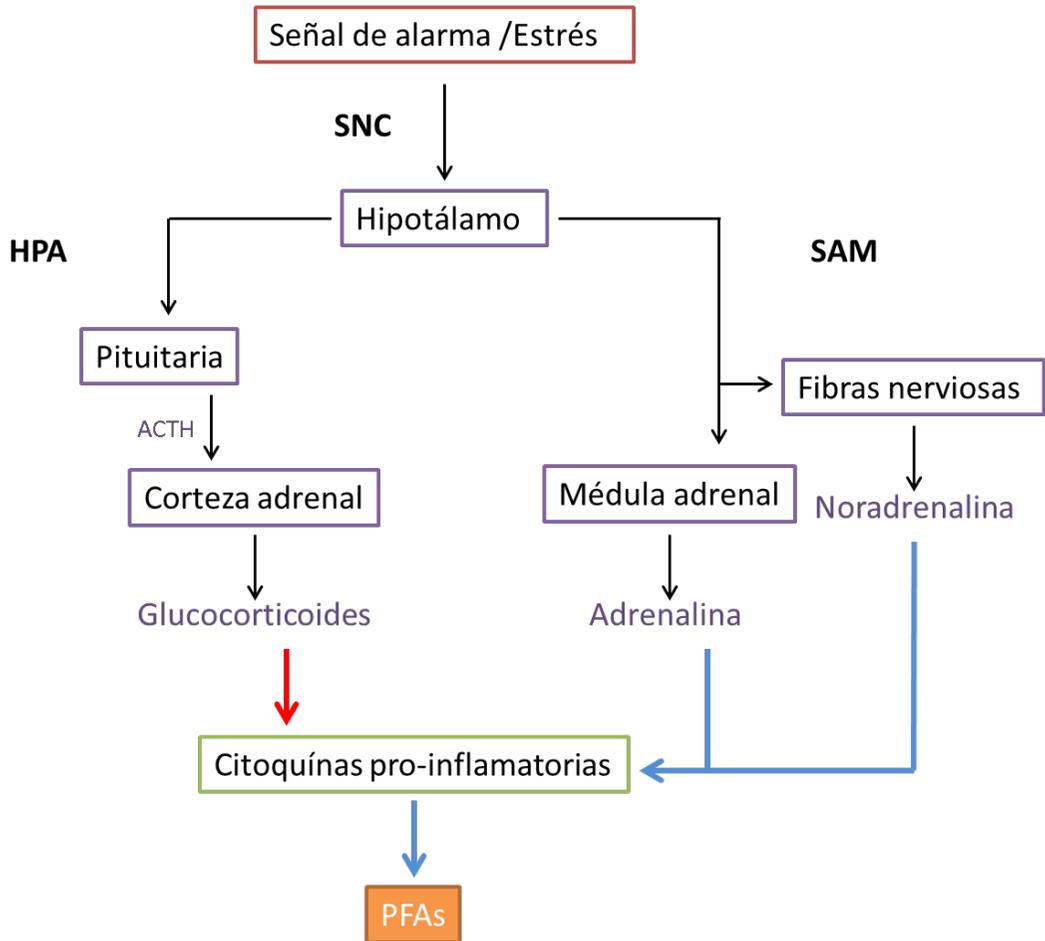
bien alimentado, puede expresar su comportamiento innato y no sufre dolor, miedo o distrés (WOAH, 2018).

Teóricamente, un animal puede encontrarse en tres situaciones diferentes en cuanto a su grado de adaptación al ambiente. En primer lugar, si el ambiente es totalmente inadecuado, la adaptación será imposible y el animal morirá o bien sufrirá lesiones o enfermedades. En este caso la mortalidad, la incidencia de lesiones causadas por el ambiente (por ejemplo, lesiones causadas por suelo inadecuado o debidas a otros animales) y la incidencia de enfermedades causadas por el ambiente actúan como indicadores de falta de bienestar. En segundo lugar, es posible que el animal consiga adaptarse al ambiente, pero que dicha adaptación suponga un coste para el animal traducido en una respuesta de estrés. Una situación estresante intensa o prolongada puede tener efectos negativos en el animal, tales como disminución del crecimiento, inhibición de la función reproductiva o inhibición del sistema inmunitario, lo que constituyen indicadores de la falta del bienestar. Finalmente, un animal puede encontrarse en un ambiente lo suficientemente satisfactorio como para que su adaptación a él no le suponga un coste, en este caso el bienestar del animal será adecuado.(Zúñiga et al., 2011).

Al no poder el animal comunicar su estado, la estimación del bienestar animal es indirecta y habitualmente se deduce de la ausencia de indicadores de malestar, sufrimiento o enfermedad, así como en el conocimiento de las necesidades fisiológicas y el comportamiento de los animales (Zúñiga et al., 2011). La evaluación del bienestar animal no es un problema resuelto y la necesidad de criterios objetivos y validados científicamente se ha puesto de manifiesto. Normalmente se considera que la evaluación del bienestar debe basarse en un conjunto de indicadores que incluyan la observación del comportamiento del animal junto con la determinación de parámetros fisiológicos. Los niveles de cortisol en plasma, saliva y/o orina, se utilizan frecuentemente para la medida del estrés, pero estos parámetros pueden no reflejar una asociación con el estado emocional (Taylor et al., 2006).

Diversos estudios han mostrado una elevación de la concentración de las PFAs en situaciones que generan estrés, en diferentes especies, como la porcina, bovina, e incluso el hombre (Murata et al., 2004). Las PFAs presentan una serie de ventajas como biomarcadores, ya que son una medida fácilmente cuantificable, se ha visto que se elevan en situaciones de distrés o estrés amenazante. Además la extracción de sangre no altera de forma significativa los niveles de estas proteínas (Ceron et al., 2005).

Cuando el animal percibe una amenaza, las señales de estrés originadas en el animal son transmitidas al hipotálamo, activando el eje hipotalámico-pituitario-adrenocorticotrópico (HPA) y el eje simpático-adreno-medular (SAM), permitiendo una liberación de glucocorticoides y catecolaminas, respectivamente (Aich et al., 2009). La liberación de glucocorticoides por parte del HPA, produce la activación del receptor de glucocorticoides en los leucocitos, lo que resulta en la inhibición de los genes pro-inflamatorios que median la transcripción de las citoquina pro-inflamatoria y por tanto una supresión de la respuesta inflamatoria. Por otra parte los glucocorticoides pueden actuar sinérgicamente con las citoquinas pro-inflamatorias favoreciendo la síntesis de algunas PFAs. Durante la respuesta al estrés las fibras nerviosas del sistema nervioso simpático liberan noradrenalina directamente en los tejidos parenquimatosos implicados en la hematopoyesis y las interacciones entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos. Las fibras nerviosas también estimulan la glándula adrenal liberando adrenalina a la circulación sistémica. Ambos neurotransmisores regulan la función vascular. Se considera que las moléculas liberadas por el SAM participan también en la activación de la transcripción de las citoquinas pro-inflamatorias, que, como se ha explicado previamente, inducen la síntesis de PFAs en el hígado. (Murata et al., 2004; Irwin et al., 2011).



Adaptación de Murata et al., 2004. The Veterinary Journal

Figura 3. Implicación de los ejes hipotalámico-pituitario-adrenocorticotrópico (HPA) y simpático-adreno-medular (SAM) en la respuesta fisiológica al estrés, a partir de la activación del sistema nervioso central (SNC) ante una señal de peligro o alarma. Flechas azules indican que promueven la actividad, flechas rojas indican una actividad inhibitoria.

En relación a la especie bovina se han observado aumentos en la concentración de SAA y Hp tras el transporte de los animales (Arthington et al., 2003) y asociados a cambios en la forma de alojamiento de los animales (Gonzalez et al., 2008; Saco et al., 2008). También se ha visto que los niveles de PFA pueden verse alterados notablemente como consecuencia del transporte en

cerdos (Saco et al., 2003; Piñeiro et al., 2007b; Salamano et al., 2008), siendo el aumento mayor cuando las concentraciones de transporte no son óptimas (Piñeiro et al., 2007b). Se han observado igualmente cambios en los niveles de las PFAs asociados a diferentes situaciones de estrés como el hacinamiento (Marco-Ramell et al., 2011), mezcla con nuevos animales, o cambios en las pautas de alimentación (Piñeiro et al., 2007a). En el caso del perro se han observado modificaciones de los valores de concentración de CRP, SAA y Hp, después de un periodo de caza (Casella et al., 2013) y también tras el transporte (Fazio et al., 2015), aunque en este caso los cambios observados son mínimos debido al corto periodo de tiempo evaluado.

2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Antecedentes y objetivos

La concentración de PFAs se eleva en el perro en muy diferentes situaciones patológicas. Aunque no es un parámetro que permita determinar la causa de la elevación, y no pueden utilizarse con un test primario para la detección de una determinada enfermedad, presenta una elevada sensibilidad para la detección de situaciones que alteran la salud del animal y pueden proporcionar evidencia de que el animal presenta inflamación o infecciones subclínicas. Como se ha comentado en la introducción, se han publicado numerosos estudios que describen las PFAs como biomarcadores en diferentes tipos de enfermedades que afectan a la especie canina. (Revisado en Cerón 2005, Eckersall 2010).

Al igual que en la especie humana en el perro la concentración basal de CRP es baja, y aumenta rápidamente durante los procesos inflamatorios. Presenta además una vida media corta, por lo que su monitorización es adecuada para el seguimiento del curso de la enfermedad. El caso del perro puede considerarse similar a los casos en pediatría, donde la CRP es utilizada con gran frecuencia debido a su carácter inespecífico (permite detectar un amplio espectro de patologías) en un paciente que no puede explicar sus síntomas. Como se ha indicado anteriormente la sensibilidad y especificidad de este análisis para la detección de procesos inflamatorios es superior a la que proporcionan otros parámetros inespecíficos de inflamación. Además las PFAs pueden utilizarse para detectar inflamación en animales en los que la médula ósea no puede responder al estímulo inflamatorio, como en casos de tratamientos con quimioterapia y leucemia. Por otra parte la CRP es un parámetro bastante estable. Sus niveles basales, así como la capacidad de detectar una respuesta inflamatoria, no se ven afectados por los tratamientos con esteroides o antiinflamatorios no esteroideos, que si afectan a otros marcadores de la respuesta inflamatoria como por ejemplo la fiebre. Por otra parte, las PFAs son más estables que los componentes celulares de la sangre, y los ensayos pueden realizarse en muestras de suero o plasma congeladas (Ceron et al., 2005).

La CRP posee ventajas desde el punto de vista diagnóstico para el seguimiento de procesos inflamatorios, sin embargo otras PFAs pueden ser interesantes desde el punto de vista diagnóstico, bien porque su cinética es más lenta y prolongada (tardan más en aumentar pero permanecen elevadas más tiempo), o bien porque su respuesta puede ser diferente en función de la patología que afecta al animal y podrían tener interés como herramientas de diagnóstico diferencial. Por ejemplo en estudios recientes se ha visto que los perros con enfermedades nasales presentan niveles elevados de CRP y Hp, y que la concentración de esta última es diferente en los animales que presentan aspergilosis y los que presentan rinitis crónica (Sheahan et al., 2010). El uso de proteínas como la AGP, o una combinación de PFAs (Chase et al, 2012), podría ser interesante para el diagnóstico y seguimiento de diferentes tipos de cáncer, permitiendo predecir la recaída antes de que se detecte sintomatología clínica (Hann, 1999).

El interés en el uso de las PFAs como biomarcadores de salud y bienestar animal ha ido incrementando progresivamente en las últimas décadas. Sin embargo la falta de metodología específica de especie, adecuadamente validada, se ha considerado como una de las principales limitaciones para la incorporación de estos parámetros en la clínica (Kjelgaard-Hansen et al., 2011). Aunque actualmente existen diferentes métodos para la cuantificación de las principales PFAs caninas, los resultados obtenidos con las diferentes metodologías pueden ser en algunos casos muy variables, debido a la falta de estandarización de las medidas analíticas. En este sentido el uso de métodos adecuadamente validados, así como de un material de referencia común al que poder referir las medidas, sería fundamental para poder obtener resultados comparables entre laboratorios.

El origen de esta tesis se encuentra en los trabajos pioneros llevados a cabo en el departamento de bioquímica y biología molecular y celular, por el grupo del Profesor Lampreave, que llevaron a la caracterización de la respuesta de fase aguda en la especie porcina, y el descubrimiento de la Pig-MAP, nueva proteína sérica y PFA principal en el cerdo, también conocida como ITIH4

(Lampreave et al., 1994; Gonzalez Ramón et al., 1995). La pig-MAP ha sido ampliamente estudiada por el grupo del departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza en diferentes modelos de fase aguda, incluyendo infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, y en diferentes situaciones causantes de estrés, demostrando ser un excelente marcador de situaciones patológicas y distrés en el cerdo (Heegaard et al, 2011; Piñeiro et al., 2007). Muchos de estos trabajos fueron posibles gracias a la colaboración con varios grupos europeos en dos Acciones Concertadas y un Proyecto Europeo, dedicados al estudio de las PFAs porcinas y su posible utilización en la medicina veterinaria. Al mismo tiempo se estudió la nueva proteína ITIH4 en otras especies como la humana, bovina y ovina, donde también se comporta como PFA positiva.

En esta tesis se continúan estos estudios centrados en la especie canina, El objetivo general de este trabajo ha sido caracterizar la respuesta de la ITIH4, junto con otras PFAs caninas en diferentes situaciones de fase aguda y estudiar sus posibles usos como biomarcadores en diferentes procesos inflamatorios o enfermedades caninas. Para ello se ha aislado la proteína y se han preparado anticuerpos específicos con los que se ha desarrollado metodología analítica para su cuantificación en suero. La ITIH4 se ha evaluado junto con otras de las principales PFAs caninas en diferentes modelos experimentales. Para la cuantificación de estas PFAs se ha desarrollado y validado, igualmente, metodología analítica propia, específica para la especie canina.

Como se ha indicado anteriormente las PFAs pueden aumentar también en situaciones de estrés, por lo que se ha propuesto su uso como marcadores generales de bienestar animal. Como es bien sabido el bienestar animal, su evaluación y mejora, es un tema de interés creciente, no solo en animales de granja, sino también en animales de compañía. Prueba de ello es la reciente creación de la norma AENOR para la certificación de centros de protección animal, promovida por AVEM (Asociación Española de Veterinarios Municipales). La evaluación del bienestar animal es un tema complejo, y el disponer de parámetros objetivos para su evaluación resulta de gran relevancia. Por ello esta

tesis incluye un estudio en colaboración con AVEM para determinar los niveles de PFAs en animales alojados en centros de protección y su posible utilización como marcadores de bienestar animal.

A continuación se detallan cada uno de los objetivos de esta tesis:

Objetivo 1. Aislamiento y caracterización de la ITIH4 y otras PFAs principales en la especie canina. Las proteínas purificadas durante el desarrollo de este trabajo han sido: ITIH4, CRP, Hp y GPA

Objetivo 2. Obtención de antisueros y anticuerpos específicos para cada una de las cuatro proteínas purificadas.

Objetivo 3. Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de estas proteínas, mediante técnicas de inmunoprecipitación o ensayos inmuno enzimáticos.

Objetivo 4. Evaluación de la ITIH4, junto con otras PFAs en la especie canina, en diferentes modelos experimentales:

- cirugía mayor
- animales afectados por piometra
- animales infectados de forma experimental por *Leishmania infantum*

Objetivo 5. Evaluación de niveles de las PFAs en animales acogidos en centros de protección, como posibles marcadores de bienestar animal.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Técnicas electroforéticas

3.1.1 Electroforesis en gel de Poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE se empleó para analizar muestras proteicas de diversos orígenes. Se utilizaron geles verticales discontinuos de 0,75 mm de espesor y 8 x 7 cm, que contenían SDS al 0,1 % constituidos por un gel concentrador de 1 cm de longitud y un porcentaje de poliacrilamida del 4 % y un gel separador de 6 cm de longitud y un porcentaje de poliacrilamida que varió en el rango de 10-15 % dependiendo del tamaño molecular de las proteínas a analizar. La relación de acrilamida-bisacrilamida (Bio-Rad) en los geles fue 30:0,8. Las muestras a analizar se mezclaron en relación 2:1 con tampón de carga (TRIS/HCl 0.25M, glicerol 20%, SDS 4%, β -mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.02% pH 8.6). Se desnaturalizaron calentando a 100 °C durante 5 min en un termo-bloque o baño seco, y se aplicaron a los pocillos situados en la parte superior del gel y sumergidos en tampón de electroforesis (TRIS/HCl 0,025M, glicina 0,192M, SDS 1%, pH 8,6). La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 1 hora 30 min a 120V, 20 mA por gel. A continuación las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie (apartado 3.1.3) o se transfirieron a membrana (apartado 3.1.2). En todos los casos en uno de los pocillos se aplicó una solución de marcadores de pesos moleculares preteñidos (rango 10-260kDa, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas).

3.1.2 Transferencia de proteínas a membranas

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham Biosciences) mediante un sistema de transferencia semiseca (Trans-Blot SD semidry transfer cell, Bio-Rad). Tras sumergir la nitrocelulosa y el gel durante 5 minutos en el tampón de transferencia (TRIS/HCl 0,048 M, glicina 0,039 M, SDS 0,037 %, metanol 20 % pH 9,2) (Bjerrum and Schafer-Nielsen, 1986) se colocó sobre el ánodo una capa de papel de filtro grueso (Whatman) humedecida con el tampón de transferencia,

sobre ella la nitocelulosa, a continuación el gel y por último otra capa de papel de filtro, evitando que se formasen burbujas de aire entre las distintas capas. La transferencia se llevó a cabo a un voltaje de 20 V, 400 mA durante 1 hora. La detección de las proteínas fijadas a la nitrocelulosa se realizó utilizando anticuerpos específicos (apartado 3.6.3).

3.1.3 Tinción de proteínas

La tinción de proteínas se efectuó por inmersión de los geles durante 4-6 h en una solución colorante de azul de Coomasie (Sigma) 0,5 g/L en ácido acético glacial al 6 %, metanol al 45 % y agua destilada al 49 %. La decoloración del fondo del gel se efectuó por lavado durante 12 horas y varios cambios, con una solución decolorante que contenía ácido acético glacial al 10 %, metanol al 25 %, glicerol 2 % y 63 % de agua destilada. A continuación los geles fueron tratados con una solución preservadora (70 % metanol, 3 % glicerol, 27 % agua) para evitar su rotura durante el secado. Finalmente, se secaron entre dos láminas de papel de celofán humedecidas en la solución preservadora, y sujetas a una placa de vidrio para evitar que se distorsionaran.

3.2 Purificación de proteínas

Para la purificación de las diferentes proteínas séricas aisladas en este trabajo se utilizaron sueros de perro con diferentes procesos inflamatorios, que fueron proporcionados por la profesora Anna Bassols (Servicio de Bioquímica Clínica de la Universidad Autónoma de Barcelona).

3.2.1 Purificación de CRP

La proteína C-reactiva se ha purificado mediante cromatografía de afinidad con una resina de agarosa a la que se ha unido covalentemente fosforilcolina (Pierce™ p-Amino Phosphoryl Choline Agarose, ThermoFisher).

Se hizo pasar a flujo lento una cantidad de 200 mL de suero de perro a través de la columna de 5 mL de fosforilcolina-agarosa, previamente equilibrada en tampón TRIS 0,05 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 2mM, azida sódica al 0,1%, pH 8 (Tampón TRIS-Ca). Tras lavar exhaustivamente con el mismo tampón, la proteína fijada a la columna se eluyó en fracciones de 1,5 mL utilizando como tampón de elución TRIS 0,05M, NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM, azida sódica 0,1 % pH 8 (tampón TRIS-EDTA). La proteína obtenida se dializó frente a tampón de diálisis (TRIS 0,1 M, NaCl 0,2 M, azida sódica 0,1%, pH 7,5), se concentró mediante centrifugación en tubos Amicon 30KDa (Merck Millipore) (apartado 3.3.2) hasta alcanzar una concentración de 2 mg/mL y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.2.2 Purificación de ITIH4

La proteína ITIH4 se ha aislado a partir de suero de perro, no necesariamente de fase aguda, mediante una cromatografía de inmunoafinidad utilizando una columna que contenía anticuerpos anti Pig-MAP unidos de manera covalente a una columna HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare) de 1 mL (apartado 3.6.2.1). Esta etapa de inmunoafinidad aprovecha la fuerte reactividad cruzada existente entre los anticuerpos desarrollados en conejo frente a la proteína porcina Pig-MAP y su proteína homóloga canina, la ITIH4.

Tras equilibrar la columna en tampón PBS-NaCl 0,5M (KH₂PO₄ 8 mM, K₂HPO₄ 1,7 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4), se hizo pasar un volumen de 15 mL de suero de perro. Tras lavar la columna con abundante PBS-NaCl 0,5 M (5 volúmenes) y comprobar que la Abs_{280nm} del excluido era menor que 0,01, se eluyó con Glicina-HCl (Glicina 0,1 M, NaCl 0,4 M, pH 2,8) en volúmenes de 1 mL sobre tubos que contenían suficiente cantidad de K₂HPO₄ 0,5 M para neutralizar el pH. Se recogieron todas las fracciones eluidas y se dializaron frente a PBS. La proteína se concentró mediante centrifugación en tubos Amicon de 30 KDa (apartado 3.3.2) hasta alcanzar 1 mg/mL y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.2.3 Purificación de Haptoglobina

La purificación de haptoglobina (Hp) se llevó a cabo a partir de un suero de perro de fase aguda mediante un procedimiento que constaba de las siguientes etapas: precipitación fraccionada con sulfato amónico saturado, seguida de una cromatografía en Azul de Cibacron – Sheparose 4B, y una posterior filtración en Sephacryl S200.

Precipitación con sulfato amónico

Se realizó una precipitación de las proteínas de suero con una disolución saturada de sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En primer lugar se realizó una precipitación añadiendo a 50 mL de suero el volumen necesario de solución de sulfato amónico saturado para alcanzar un 40% de saturación de sulfato amónico en la mezcla. Tras incubar durante 1 hora a 4 °C y en agitación se centrifugó a 5000g y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió con cuidado separándolo de la fracción precipitada. A este sobrenadante se le añadió más sulfato amónico hasta alcanzar una concentración de sulfato amónico equivalente al 60 % de saturación. Se incubó en agitación durante 1 hora a 4 °C y se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos a 5000g. Se retiró con cuidado el sobrenadante de la fracción precipitada. El precipitado obtenido se resuspendió con un volumen de PBS igual a la mitad del volumen de suero de partida, eliminándose el sulfato amónico mediante diálisis frente a PBS.

Cromatografía de Azul de Cibacron

La fracción precipitada con sulfato amónico al 60 % de saturación, que contenía Hp y albúmina como componentes principales, se sometió a una cromatografía en una columna de Azul de Cibacron – Sepharose 4B, previamente equilibrada en tampón TRIS 0,02 M, NaCl 0,05M pH 7,5 (Tampón de Lavado). El tamaño de la columna de Cibacrom y el volumen del precipitado re-suspendido y dializado, se adecuó en proporción 1:1 (v:v).

Tras aplicar la muestra y lavar la columna con el Tampón de Lavado, se reunieron los tubos del pico principal de la fracción excluida entre los que se encontraba la Hp. La fracción obtenida fue dializada frente a PBS y se concentró 10 veces respecto del volumen inicial del suero de partida. Tras continuar el lavado de la columna de Cibacron con un volumen de tampón de lavado 5 veces mayor que el de la columna, se eluyeron las proteínas fijadas con tampón TRIS 0,05 M, NaSCN 0,2 M, pH 8,0, lo que permitió obtener albúmina de perro bastante purificada, que se guardó para otros usos.

Filtración en gel (Sephacryl S200)

La fracción de Hp obtenida en la etapa anterior se hizo pasar por una columna de Sephacryl S200 High Resolution (GE Healthcare). Las dimensiones de la columna fueron: 1 m de altura y 1,5 cm de diámetro. Tras equilibrar la columna en PBS, se hizo pasar por la columna 1 mL de la fracción concentrada a un flujo constante y continuo. Se recogieron fracciones de 1mL, se midió la absorbancia a 280 nm y se representó el cromatograma. Los tubos que formaban los principales picos del cromatograma se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE y western-blot (apartados 3.1.1 y 3.6.5.1). Las fracciones que contenían Hp se reunieron y concentraron hasta alcanzar una concentración de 2 mg/mL. Para aumentar el grado de pureza de la Hp, se realizó una segunda filtración en gel.

3.2.4 Purificación de α_1 -glicoproteína ácida

El procedimiento utilizado para la purificación de α_1 -glicoproteína ácida (GPA) se basó en su propiedad de mantenerse en solución en medios con sales o disolventes en los que precipitan la mayoría de las proteínas plasmáticas.

La primera etapa consistió en una precipitación del suero de partida con una solución precipitante que contenía sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 420 g/L y ácido tricloroacético (TCA) 24,75 g/L. La precipitación se realizó en proporción 1:1 (v:v) de suero de perro con la disolución precipitante. Esta disolución se añade poco a

poco a la muestra, en baño de hielo y en agitación. Se ajusta el pH de la mezcla a 3,0 y posteriormente se centrifugó a 5000g y 4 °C durante 30 minutos.

A continuación, el sobrenadante; que contenía la GPA, se dializó frente a citrato sódico 0,025 M, pH 5,1. El siguiente paso consistió en pasar el sobrenadante dializado por una columna de intercambio catiónico de Amberlita IRC-50, que estaba equilibrada también en el tampón de citrato. La fracción excluida de la columna de Amberlita fue reunida y tras ser dializada frente a PBS y concentrada hasta una concentración de 2 mg/mL, se almacenó a -20°C como GPA canina.

3.3 Concentración de soluciones proteicas por ultrafiltración

3.3.1 Concentración de muestras por presión de nitrógeno

Las muestras cuyo volumen era superior a 10 mL se concentraron en una célula con agitación Amicon (Merck Millipore) con discos de ultrafiltración (Merck Millipore). El tamaño de poro de la membrana varió en función del tipo de muestra que se quiso concentrar y de su peso molecular, siendo de 100 KDa para concentrar antisueros, fracción IgG o anticuerpos inmunopurificados y de 30 KDa para concentrar las proteínas purificadas ITIH4, Hp y AGP. Para llevar a cabo la concentración se ajustó la presión a 2 bar de N₂. El tiempo necesario fue variable según el volumen y la concentración iniciales de las muestras. Después de su uso, cada membrana se regeneró con NaOH 0,1M (15 minutos con agitación) y se lavó con agua destilada durante 15 minutos con agitación para después conservarla a 4 °C en etanol al 50 % en agua.

3.3.2 Ultrafiltración impulsada por centrifugación

Las muestras con un volumen máximo de 10 mL se concentraron hasta 500 µL por centrifugación en tubos Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) sometidos a una fuerza centrífuga relativa de 5000g. Como en el caso anterior el tamaño de poro de la membrana del tubo Amicon se seleccionó según el tipo de muestra a

concentrar 30KDa para las proteínas purificadas y 100 KDa para antisueros, fracción IgG o anticuerpos inmunopurificados. Después de su uso, cada membrana se regeneró con NaOH 0,1 M (5000g, 5 minutos) y se lavó con agua destilada (5000g, 5 minutos) para después guardarla en etanol al 50 % en agua destilada.

3.4 Cuantificación de proteína total

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Biuret (Gornall et al., 1949). Como estándar se utilizó una solución de albúmina bovina (2 mg/mL)

Este método, se utilizó también para la determinación de las concentraciones de las proteínas CRP, ITIH4, Hp y GPA. Dichas proteínas purificadas se usaron como patrones primarios para valorar el suero estándar (patrón secundario) utilizado en las técnicas de inmunodifusión radial y ELISA.

En el caso de los anticuerpos inmunopurificados la cuantificación de estos se realizó mediante la medida de Abs_{280nm} de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C = Abs_{280nm} \cdot 1,36$$

Siendo:

C: concentración de anticuerpos expresada en mg/mL

Abs_{280nm} : la absorbancia medida a 280nm

1,36: el coeficiente de extinción para las IgGs de conejo

También se realizó una medida de la Abs_{320nm} para comprobar comprobando el estado de agregación de los mismos. En los casos en que los valores de absorbancia a 320 nm fueron muy elevados, se centrifugaron las muestras para eliminar los anticuerpos agregados y se volvió a medir la Abs_{280nm} para recalcular la concentración del mismo modo.

3.5 Identificación de proteínas

La identificación y por tanto confirmación de las proteínas purificadas, se llevó a cabo mediante MALDI-TOF. En el caso de la proteína ITIH4, por ser una proteína de la que no se tenía constancia que se hubiera purificado anteriormente se procedió a una doble confirmación mediante identificación por sistema de LC/MS MS

En ambos casos la identificación de las proteínas se realizó a partir de las bandas de proteínas que mostraron los geles de SDS-PAGE al aplicar las proteínas una vez purificadas. Dichas bandas fueron recortadas manualmente en campana de flujo laminar con ayuda de un bisturí y conservadas en agua miliQ estéril hasta su digestión.

3.5.1 MALDI TOF MS

Las bandas de proteínas extraídas manualmente del gel SDS-PAGE y transferidas a tubos cónicos de 600 µL que contenían agua miliQ se enviaron a la unidad de proteómica, Servicios Científico Técnicos del CIBA, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud-Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Zaragoza. La digestión de las muestras fue llevada a cabo con un digestor automático (Digestor MSI Complete, Intavis AG, Koeln, Germany) siguiendo el protocolo descrito por Mato (Mato et al., 2015). El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, se llevó a cabo usando un MALDI-TOF TOF 4800plus (ABSciex). La búsqueda de las secuencias proteicas se llevó a cabo en la base de datos NCBI usando el software Mascot (Matrix Science Ltd.)

3.5.2 LC-MS/MS

El análisis mediante LC-MS/MS fue realizado por el Laboratorio de Proteómica CSIC/ Universidad Autónoma de Barcelona. Las muestras fueron derivatizadas con iodoacetamida y digeridas de acuerdo a protocolos internos. El extracto digerido con tripsina se hizo pasar por una columna cromatográfica C18

(Nikkyo Technos Co.) acoplada a un sistema HPLC compuesto por una bomba Agilent 1200 capillary micro pump. El sistema MS usado fue Velos LTQ (ThermoFischer).

El espectro LC-MS/MS se obtuvo mediante el software SEQUEST (Proteome Discoverer v1.3, ThermoFisher). La base de datos Uniprot fue utilizada para la búsqueda de las proteínas.

3.6 Métodos inmunoquímicos

3.6.1 Preparación de antisueros

3.6.1.1 *Inmunización y obtención de antisueros*

Los antisueros anti-CRP, anti-ITIH4, anti-Hp, anti-GPA se obtuvieron mediante la inmunización de conejos de la raza Gigante de California (Servicio de experimentación animal-SAI, Universidad de Zaragoza) siguiendo un procedimiento aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Número PI 15/11) y que se describe a continuación.

Se preparó una mezcla de solución de proteína purificada (aproximadamente 200 µg de proteína purificada en el caso de CRP, ITIH4 y Hp y 500 µg de proteína purificada en el caso de GPA) disuelta en PBS y mezclada con el mismo volumen de adyuvante completo (Freunds Complete Adjuvants, Sigma) en la primera inmunización y adyuvante incompleto (Freunds Incomplete Adjuvants, Sigma) para las inmunizaciones de recuerdo. Los componentes se mezclaron con ayuda de una jeringuilla, hasta formar una emulsión. La emulsión se inyectó en cada conejo subcutáneamente en varios puntos de la región dorsal. El volumen de mezcla inyectada en ningún caso fue mayor de 1 mL. Tres semanas después de la primera inyección, se procedió a realizar la primera

inmunización de recuerdo. Una semana después se efectuó la primera sangría a través de la arteria central de la oreja del conejo, con la ayuda de un catéter. Tras la sangría se dejaron los animales en un periodo de recuperación de 3 semanas y se volvieron a repetir los ciclos de reinyección y sangrado de los animales de la misma manera que en la inyección de recuerdo.

Los antisueros obtenidos se analizaron por inmunolectroforesis (apartado 3.6.4.2) frente al suero de perro y a la proteína purificada correspondiente. Cada una de las sangrías se tituló de acuerdo al título de Becker y se agruparon en función del mayor o menor título para hacer lotes homogéneos.

Determinación del título

La determinación del título de los antisueros, se realizó mediante inmunodifusión radial (Becker 1969), utilizando siempre un mismo patrón establecido para cada proteína.

Para el cálculo del título, se representó el diámetro al cuadrado (d^2) de los halos de precipitación expresados en mm^2 frente a la concentración de antígeno correspondiente, expresada en $\text{mg}/100\text{mL}$. El cálculo de los títulos de los antisueros se efectuó a partir de la pendiente de la recta obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$T = 4 \cdot V_{AgP} \cdot s \cdot 3,14 \cdot pte$$

Siendo:

VAg: volumen de antígeno aplicado en cada pocillo en μL (6)

P: Porcentaje de antisuero en el gel de agarosa

s: espesor del gel de agarosa en mm (1,8)

pte: valor de la pendiente obtenida al representar d^2 (mm^2) frente a concentración ($\text{mg}/100\text{mL}$)

3.6.1.2 Preparación de inmunoadsorbentes e inmunoadsorción de antisueros

Preparación del inmunoadsorbente

Para eliminar las reactividades indeseadas de los antisueros desarrollados del modo descrito en el apartado 3.6.1.1 y obtener antisueros específicos, se realizaron inmunoadsorciones con suero de perro o fracciones del mismo que no contenían cantidades detectables de la proteína de interés. En el caso del antisuero anti-CRP se utilizó como inmunoadsorbente un suero de perro sano con baja concentración de CRP. En el caso del antisuero anti-ITIH4 se utilizaron las fracciones correspondientes a los excluidos de la columna de anticuerpos anti-PigMAP obtenidos durante el transcurso de varias purificaciones de la proteína ITIH4. Para inmunoadsorber los antisueros anti-Hp se utilizaron las fracciones de suero carentes de Hp obtenidas en la precipitación con sulfato amónico durante la purificación de dicha proteína (apartado 3.2.3). Debido a la especificidad que presentó por inmunolectroforesis, el antisuero anti-GPA obtenido no se consideró necesario someterlo a inmunoadsorción. Dichos excluidos o fracciones de suero se dializaron frente a PBS y en el caso que fuera necesario se concentraron (apartado 3.3) hasta alcanzar un valor de proteína total superior a 70 mg/mL.

La insolubilización de las fracciones seleccionadas para la preparación de los inmunoadsorbentes, se realizó según el método de Avrameas (Avrameas et al., 1969) con algunas modificaciones. El método se basa en el uso de un reactivo bifuncional, el glutaraldehído, que forma enlaces intermoleculares con los restos amino, principalmente de las lisinas.

Por cada 10 mL de suero de perro fracción seleccionada, se adicionó en primer lugar 1 mL de tampón de acetato sódico 2 M, pH 5 y seguidamente 3 mL de solución acuosa de glutaraldehído al 2,5 % (v/v) ambos se añadieron lentamente y con agitación suave. La mezcla se dejó gelificar en reposo durante 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo el gel se fragmentó con

ayuda de un bisturí y se lavó con abundante PBS hasta que la $A_{280\text{nm}}$ del PBS de lavado fue menor de 0,05. Seguidamente el gel se bloqueó con etanolamina 1 M, pH 8,0 incubando durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación rotatoria suave, o toda la noche a 4 °C. El exceso de etanolamina se retiró con una bomba a vacío. Después el gel se lavó con glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8 durante 15 minutos a temperatura ambiente y se neutralizó rápidamente con tampón fosfato 0,5 M. Finalmente se equilibró en PBS que contenía azida sódica al 0,1 %.

Inmunoadsorción de antisueros

Una vez preparado el gel de inmunoadsorbente se incubó durante al menos 20 horas, a 4 °C y con agitación suave con una solución de antisuero. La proporción de antisuero añadido al inmunoadsorbente se determinó en función del grado de inespecificidad de cada antisuero, siendo 1:1 (v:v) la proporción utilizada en la mayoría de los casos. Transcurrido el tiempo de incubación se recuperó el antisuero y se lavó el inmunoadsorbente con un volumen de PBS con azida sódica al 0,1% equivalente al volumen de inmunoadsorbente utilizado. Los lavados con PBS se realizaron incubando durante 30 minutos a 4°C y con agitación, hasta que la $A_{280\text{nm}}$ fue menor de 0,1. El inmunoadsorbente se regeneró con glicina 0,1 M, NaCl 0,4 M, pH 2,8, se neutralizó con 1 volumen de disolución K_2HPO_4 0,5 M y se reequilibró con PBS con azida sódica 0,1%.

El antisuero obtenido, junto con los lavados cuya $A_{280\text{nm}}$ era superior a 0,1 se concentraron hasta el volumen inicial de antisuero mediante ultrafiltración (apartado 3.3.1). La especificidad del antisuero obtenido se comprobó mediante inmunolectroforesis (apartado 3.6.4.2) y Western blot (apartado 3.6.5.1). El antisuero se conservó a 4 °C para uso rutinario y a -20 °C para su conservación a largo plazo.

3.6.2 Preparación de columnas de inmunoafinidad

3.6.2.1 Columna de anticuerpos anti Pig-MAP

La columna de anticuerpos anti Pig-MAP utilizada para la purificación de la ITIH4 de perro se preparó mediante la inmovilización de 4 mg de anticuerpos anti Pig-MAP, previamente desarrollados en el laboratorio, a una columna HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare) de 1 mL.

El acoplamiento se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. El isopropanol que protege los grupos NHS se eliminó haciendo pasar por la columna una solución de HCl 1 mM preenfriado, con la ayuda de una jeringa. Inmediatamente después, se añadieron a la columna los anticuerpos anti Pig-MAP concentrados hasta un volumen de 1 mL y dializados en tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M pH 8,3). Los anticuerpos se incubaron en la columna durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los anticuerpos no fijados se eluyeron con 3 mL de tampón de acoplamiento para calcular la eficacia de la fijación. Tras este paso intermedio, se lavó la columna con tres ciclos alternos de una solución de etanolamina 0,5 M, NaCl, 0,5 M pH 8,3 (6 mL) y de acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4 (6 mL). En el segundo ciclo la etanolamina se incubó durante 30 minutos para bloquear los centros activos. Finalizados los ciclos la columna se equilibró con 2 volúmenes de PBS con azida al 0,1 %.

El rendimiento de la fijación se calculó a partir de la absorbancia a 280 nm de los anticuerpos aplicados a la columna de HiTrap y de los anticuerpos no fijados a dicha columna tras la incubación. El anticuerpo eluido de la columna de HiTrap contiene muchas sales que interfieren en la medida a 280 nm. Para eliminar estas sales, 0,5 mL de dichos anticuerpos fueron cromatografiados en una columna PD-10 Desalting Column (GE Healthcare) previamente equilibrada en PBS. Una vez eliminadas las sales interferentes se recalculó la absorbancia a 280 nm de la fracción no acoplada a la columna de HiTrap.

3.6.2.2 Columnas de ITIH4 y de Haptoglobina caninas

Para la purificación de anticuerpos anti ITIH4 y anti Hp, fue necesario preparar dos columnas de inmunoafinidad, HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare) de 1 mL, en las cuales se inmovilizaron 2 mg de ITIH4 y 3 mg de Hp, respectivamente.

El acoplamiento de estas proteínas a sendas columnas, se realizó siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente en la preparación de la columna de anticuerpos anti pig-MAP utilizada para la purificación de la ITIH4 de perro.

3.6.3 Obtención de anticuerpos

3.6.3.1 Purificación de anticuerpos

La purificación de los anticuerpos específicos anti ITIH4 y anti Hp caninas se llevó a cabo haciendo pasar 3 mL de un suero anti ITIH4 o anti Hp específico (apartado 3.6.1.2) por la columna de 1mL de HiTrap-NHS a las que se habían fijado covalentemente las proteínas ITIH4 y Hp, respectivamente.

La purificación de los anticuerpos con estas columnas pre-empaquetadas se realizó con la ayuda de un equipo AKTA prime plus (Amersham Biosciences). Tras lavar la columna con PBS (5 veces el volumen de la columna), los anticuerpos fijados a la columna se eluyeron con el tampón de elución (glicina 0,1 M, NaCl 0,4 M, pH 2,8). Se recogieron fracciones de 1 mL en tubos que contenían 150 μ L de tampón de K_2HPO_4 0,5 M. Finalmente los anticuerpos se dializaron frente a PBS y se concentraron mediante presión por N_2 (apartado 3.3.1) a 4 mg/mL. Se midió la A_{280nm} y se congelaron a $-20^\circ C$ hasta su uso.

3.6.3.2 Marcaje de anticuerpos con peroxidasa

Parte de los anticuerpos inmunopurificados se unieron covalentemente a peroxidasa de rábano, (Peroxidase from horseradish, HPR IV, Sigma).

Según el protocolo previamente descrito (Avrameas 1969) se añadieron 2 mg de peroxidasa por mg de anticuerpo inmunopurificado y se disolvió suavemente. Seguidamente se añadió 50 μ L de glutaraldeído al 1 % por mL de anticuerpo. La mezcla se incubó en oscuridad durante 3 horas en agitación rotatoria. Pasado este tiempo se añadió 50 μ L de glicina 1 M y se incubó durante 2 horas de la misma manera (oscuridad y agitación rotatoria). El anticuerpo marcado se dializó frente a PBS y se conservó a -20 °C hasta su uso.

3.6.4 Técnicas de inmunoprecipitación en gel

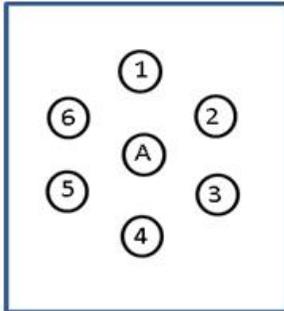
Se han utilizado diversas técnicas de inmunoprecipitación para caracterizar y cuantificar las distintas proteínas y anticuerpos generados a lo largo de este estudio. En todos los casos se prepararon geles al 1% de agarosa en agua y se aplicaron sobre placas de vidrio. Estos geles se dejaron secar hasta su completa evaporación, de manera que se formase una primera capa seca sobre el vidrio en el que luego se aplicaría el gel de agarosa sobre el que posteriormente se desarrollaron las reacciones de inmunoprecipitación.

Los inmunoprecipitados formados se lavaron durante 48 horas con abundante PBS con azida sódica al 0,1 %, realizando varios cambios. Se secó el gel por completo, se tiñó con azul de Coomasie y se lavó con una solución decolorante (apartado 3.1.3).

3.6.4.1 Inmunodifusión doble

Se utilizó un método basado en el de Ouchterlony (Ouchterlony 1949). Sobre portas de microscopio se preparó un gel de 2-3 mm de espesor al 1 % en agarosa en tampón PBS. En el gel se perforaron pocillos de 3 mm de diámetro en forma de roseta, separados entre sí de forma equidistante, en los que se colocaron las muestras, y en el centro también de forma equidistante otro pocillo en el que se colocó el antisuero.

A continuación se muestra un esquema general para el análisis de antisueros tras las sangrías:



A: Antisuero

1 y 4. Proteína purificada

2 y 5. Suero de concentración alta

3 y 6. Suero de concentración baja (o un excluido como control negativo)

En el caso de la proteína purificada y del suero de concentración alta, debe realizarse una dilución para cargar de 1 a 3 μg de la proteína a estudio. El suero de baja concentración o suero usado como control negativo se utilizará a la misma dilución que el suero de concentración alta. El antisuero se añade sin hacer ninguna dilución previa. En cada pocillo se añadió un volumen de 15 μL .

Tras aplicar las muestras en los pocillos se dejó difundir a temperatura ambiente y dentro de una cámara húmeda durante 12 – 24 horas. Pasado ese tiempo se comprobó si se habían producido líneas de precipitación y posteriormente se procedió al lavado y secado según se ha descrito anteriormente.

3.6.4.2 *Inmunoelectroforesis*

Se realizó en geles de agarosa al 1 % en tampón barbiturato sódico 25 mM, pH 8,2, con un espesor de 1,8 mm, preparados sobre placas de vidrio de 9x12 o 9,5x7,5 cm (Grabar et al., 1953). Las muestras se aplicaron en pocillos de 2,5 mm de diámetro separadas 1,5 cm a una distancia 1/4 del recorrido electroforético. Se deja un pocillo libre (preferiblemente el del extremo) para cargar 3 μL de una solución de Negro Amido de manera que indique el frente de

la electroforesis. Los contactos entre el gel y las cubetas que contenían el mismo tampón que el gel, se efectuaron mediante puentes de papel Whatman nº 1. La separación electroforética se realizó durante 1 hora y media a 120 V.

Una vez realizada la electroforesis se practicaron unos canales de 1,5 mm, equidistantes entre los pocillos, donde se aplicaron 100 µL del antisuero correspondiente. Se dejó difundir durante 24-48 horas en cámara húmeda y el gel se lavó, secó y tiñó como anteriormente se ha explicado.

3.6.4.3 Inmunodifusión radial

Para valorar de forma cuantitativa y específica las proteínas de una matriz compleja como es el suero sanguíneo se realizó inmunodifusión radial (Mancini et al., 1965), utilizando geles de agarosa al 1 % en tampón barbiturato sódico 25 mM, pH 8,2, de 1,8 mm de espesor. En la preparación del gel se incluyó una proporción de antisuero, cuando la agarosa se encontraba fundida y atemperada a 56 °C. La proporción de antisuero depende de su concentración de anticuerpos específicos y del rango de concentración de las muestras a analizar, ajustándose ambas experimentalmente. Se practicaron unos pocillos de 2,5 mm de diámetro separados 2 cm entre sí. Aplicadas las muestras (6 µL) se dejaron difundir 48 horas en cámara húmeda. Posteriormente se lavó, se secó y se tiñó de la manera habitual. La medida del diámetro de los círculos de inmunoprecipitación permite una determinación cuantitativa de la proteína que se realiza con referencia a una serie de patrones con concentraciones conocidas de la proteína a analizar.

3.6.5 Métodos inmunoenzimáticos.

3.6.5.1 Western blot.

Tras la transferencia de proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa (3.1.1 y 3.1.2), la detección específica de cada proteína se realizó según el método descrito por Towbin (Towbin et al., 1979) con alguna modificación detallada a continuación.

Las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con una solución de leche semidesnatada en polvo al 5% (p/v) en PBS-azida sódica. Seguidamente las membranas se lavaron 4 veces durante 2 minutos con agitación vigorosa, con una solución que contenía TRIS/HCl 0,01M, NaCl 0,2M, Tween-20 0,5% pH 8,0 (tampón B). Posteriormente se incubaron durante 1 hora con el correspondiente antisuero o anticuerpo específico disuelto en tampón B con leche en polvo al 0,17% (p/v). La dilución óptima se determinó en cada caso. Finalizada la incubación se lavó 4 veces con tampón B del mismo modo descrito anteriormente. A continuación las membranas se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo, marcado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido en tampón B con leche al 0,17% (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. Tras lavar con el tampón B 4 veces, los inmunocomplejos se detectaron mediante un revelado químico o un revelado quimioluminiscente.

El revelado químico se efectuó sobre la membrana añadiendo una solución preparada en el momento de su utilización, que consta de: 11 mL de tampón TRIS/HCl 0,2 M, MgCl₂ 1 mM, pH 9,6; 0,185 mL de una solución de 4 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) en dimetilformamida (DMF) y 1,25 mL de una disolución 1 mg/mL de nitroazul de tetrazolio (NBT) en DMF (Sigma). Las soluciones stock de BCIP y NBT se conservaron en oscuridad a -20 °C. La reacción se detuvo eliminando la solución de revelado y lavando la membrana con abundante agua destilada.

En los casos en los que se deseó conservar la membrana para un posterior revelado con otro anticuerpo, se utilizó un revelado quimioluminiscente. En este caso el anticuerpo secundario utilizado fue un anti-IgG en conejo marcado con peroxidasa. El inmunocomplejo formado fue activado con un sustrato comercial para la detección de la enzima peroxidasa (Enhanced chemiluminescent substrate for detection of HRP, PierceTM ECL Western Blotting Substrate, Thermo). Tras la exposición controlada de la peroxidasa activada del inmunocomplejo en una membrana Amersham Hyperfilm (GE Healthcare), el revelado se llevó a cabo mediante la inmersión de la membrana primero en una

solución de revelado (Kodak) hasta que aparecieron las bandas de inmunocomplejo, y tras lavar con agua destilada, por inmersión en una solución de fijación. El paso de exposición y revelado se realizó en un cuarto oscuro.

En ambos casos el tiempo de revelado, y en caso del revelado quimioluminiscente el tiempo de exposición, depende de la cantidad de muestra aplicada (cantidad de proteína a revelar) y de la sensibilidad del anticuerpo utilizado.

3.6.5.2 ELISA

En este trabajo se han desarrollado dos ELISAS tipo sándwich para la cuantificación de las proteínas ITIH4 y Hp caninas, respectivamente. En el desarrollo de ambos ELISAS se utilizó la misma metodología.

Preparación de placas tapizadas con el anticuerpo

Los anticuerpos inmunopurificados (apartado 3.6.3.1) se diluyeron en PBS estéril que contenía timerosal al 0,01% y se llevaron a la concentración deseada, 4 µg/mL para el ELISA de Hp y 6 µg/mL para el ELISA de ITIH4. 100 µL de esta disolución que contenía el anticuerpo de captura, se dispensaron en cada uno de los pocillos de microplacas partibles de 96 pocillos (12 x 8) (Greiner bio-one) con ayuda de una pipeta multicanal y se incubó a 4 °C durante un periodo de tiempo comprendido entre 16 y 18 horas.

Pasado este tiempo, el anticuerpo se retiró y los pocillos se lavaron tres veces con PBS, con ayuda de un lavador de placas (Tecan). Para evitar el pegado inespecífico de otras proteínas al plástico, cada uno de los pocillos de las placas se incubaron con 300 µL de una solución de ovoalbúmina al 3 % en PBS, durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras retirar la ovoalbúmina se lavaron los pocillos 4 veces con PBS y se dejaron secar las placas a temperatura ambiente. Una vez secas las placas se embolsaron y se sellaron con una bolsa de agente desecante en su interior y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Cuantificación mediante ELISA

Las muestras de suero de perro se diluyeron, como se indica en la Tabla 5, en un tampón que contenía PBS con ovoalbúmina al 0,05 % pH 7,4. Se aplicaron 100 μ L de muestra en cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar tres veces con PBS, los pocillos se incubaron durante 30 minutos con 100 μ L de anticuerpo marcado con peroxidasa (Ab conjugado) (apartado 3.6.3.2) diluido en el mismo tampón de dilución que las muestras. Pasado ese tiempo y tras lavar tres veces con PBS se añadieron a cada pocillo 100 μ L de una solución de sustrato cromógeno 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) (Pre-stained TMB Plus-2, KEM EN TEK Diagnostics) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo 100 μ L de una solución de ácido sulfúrico 0,5 N. Se midió la absorbancia a 450 nm de cada uno de los pocillos de la placa con un lector de placas (Sunrise, Tecan). La concentración de proteína en las muestras problema se calculó por interpolación en una curva de calibrado obtenida con una muestra de suero estándar de concentración conocida, utilizado también para la inmunodifusión radial.

Aunque la metodología desarrollada fue la misma para los dos ELISAS desarrollados, la dilución de las muestras de suero y del anticuerpo conjugado tuvo que ajustarse para cada uno de los ELISAS desarrollados, así como el rango de concentraciones de la recta de calibrado.

Tabla 5. Condiciones específicas de la curva de calibrado, dilución de muestra y dilución de conjugado para cada uno de los ELISAS desarrollados.

	ELISA ITIH4	ELISA Hp
Rango curva de calibrado	21 - 700 ng/mL	4 - 130 ng/mL
Dilución del suero	1/4000	1/50000
Dilución del Ab conjugado	1/6000	1/120000

3.6.6 Método inmunoturbidimétrico para la cuantificación de CRP canina

El desarrollo de un método inmunoturbidimétrico para la determinación de proteína C-reactiva en suero de perro se realizó en el contexto de un proyecto INPACTO (IPT-010000-2010-001), mediante el desarrollo de inmunopartículas de latex asociadas de manera covalente al anticuerpo anti CRP (Piñeiro et al., 2018). El fundamento de esta técnica se basa en la turbidez producida debido a la formación de inmunoagregados que se da cuando la CRP reacciona con las inmunopartículas.

La determinación de CRP se realizó de forma automática, utilizando un analizador Olympus AU400. Tres microlitros de suero de perro, se mezclan con 230 μL de tampón de reacción (R1) al que se le añaden 70 μL de inmunopartículas de latex (R2) y se mide la $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ inmediatamente después de mezclar. Tras incubar a 37 °C durante 4 minutos se realiza una segunda lectura a la misma longitud de onda. El aumento de la turbidez se determina mediante la medida de Abs a 600nm (segunda lectura menos primera), y es proporcional a la concentración de CRP en la muestra. La concentración de CRP se calcula mediante interpolación en la curva de calibrado construida a partir de las diluciones del calibrador de CRP. El analizador calcula de forma automática la concentración de CRP a partir de la curva de calibrado obtenida con los calibradores, mediante un ajuste poligonal

3.7 Validación de métodos analíticos

La validación de los métodos ELISA desarrollados en esta tesis se realizó mediante la determinación de los siguientes parámetros: límites de detección y cuantificación, imprecisión (repetitividad y reproducibilidad), y veracidad.

El límite de detección (LoD) y de cuantificación (LoQ) se determinó mediante la medida de muestras de blanco, compuestas por el tampón de dilución de muestra sin analito, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{LoD} = C \text{ media} + 3 \times \text{SD}; \quad \text{LoQ} = C \text{ media} + (10 \times \text{SD})$$

Siendo:

C media: media de las concentraciones obtenidas al interpolar la Abs obtenida para la muestra de blanco en la recta de calibrado

SD: desviación estándar de la media

La imprecisión del ensayo se evaluó para muestras con diferentes concentraciones de antígeno, mediante la determinación de los coeficientes de variación. La repetitividad se determinó mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido al medir 10 veces la misma muestra en una misma placa (CV intra-ensayo). La reproducibilidad fue determinada mediante el cálculo del CV obtenido al determinar la misma muestra en 10 ensayos diferentes (CV inter-ensayo).

$$CV \% = \frac{SD}{Conc Media} \times 100$$

Siendo:

Conc media: La media de las concentraciones obtenidas en los ensayos

SD: desviación estándar

Al no existir un método o material de referencia, la veracidad de los métodos desarrollados se determinó mediante ensayos de recuperación, el estudio de la linealidad y la comparativa con métodos alternativos previamente validados.

Linealidad. Se prepararon muestras con cantidades crecientes de analito disuelto en tampón de dilución de muestra, que cubrían el rango analítico del ensayo. La concentración de las muestras obtenidas se determinó por duplicado y se representó gráficamente el valor obtenido frente al valor esperado para cada una de las muestras y se evaluó el ajuste mediante mínimos cuadrados. De la misma forma se determinó el porcentaje de recuperación para cada una de las muestras mediante el siguiente cálculo:

$$Recuperación \% = \frac{C obtenida}{C esperada} \times 100$$

Siendo:

C obtenida: la concentración del analito medida

C esperada: la concentración del analito teórica que contiene la muestra

Comparativa entre métodos. Los valores obtenidos por ELISA para un mínimo de 40 sueros de perro de diferentes concentraciones se compararon con los valores obtenidos para los mismos sueros determinados mediante el método analítico de comparación. Se representaron los datos obtenidos para cada suero por cada una de las técnicas y se realizó un ajuste mediante regresión lineal, al tiempo que se determinó el grado de correlación de ambas técnicas y la bondad del ajuste.

3.8 Determinación de PFAs en modelos experimentales

3.8.1 Medida de los niveles de PFAs en muestras de cirugía mayor

Animales y toma de muestra

Las muestras de animales sometidos a cirugías fueron proporcionadas por la Dra Amaia Unzueta del Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza.

Se analizaron las muestras de suero obtenidas de perras sanas sometidas a ovariectomía y de otras con tumores mamarios sometidas a mastectomía. El grupo de animales sometidos a ovariectomía, consistía en 9 perras con edades comprendidas entre 5 meses y 9 años. El grupo de animales sometidos a mastectomías estaba formado por 10 perras con edades entre 7 y 13 años. Ambos grupos de animales estaban comprendidos por individuos de diferentes razas: siete animales mestizos, dos Cocker, dos Caniches, un Pastor Alemán, un Chihuahua, un Terrier, un Galgo, un Braco Alemán, un Setter, un Bulldog Inglés y un Teckel.

Los animales sometidos a ovariectomía (OVH) eran animales sanos sometidos a esterilización quirúrgica y ninguno de ellos mostraba signos de procesos inflamatorios previos y tampoco estaban afectados por piometra.

De acuerdo con el sistema de la clasificación de tumores en animales domésticos establecido por la organización mundial de la salud (Owen 1980), el estudio anatomopatológico de los tumores encontrados en los animales sometidos a mastectomía permitió agruparlos en: cuatro tumores mamarios mixtos benignos, tres adenomas, dos adenomas complejos y un adenocarcinoma complejo. El tamaño de estos estaba comprendido entre 3 mm y 2 cm y en ningún caso se encontró invasión en vasos linfáticos ni metástasis en los nódulos.

La toma de muestra se realizó para cada animal justo antes de la cirugía (control de cada animal) y 24 horas después de la cirugía (post cirugía) de acuerdo a los protocolos del Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza. No fue posible obtener una muestra a un tiempo mayor, debido a que el tiempo de hospitalización de los animales no supera las 24 horas.

Cuantificación y análisis estadístico

La cuantificación de CRP, ITIH4, Hp y GPA, se realizó mediante inmunodifusión radial, utilizando los antisueros específicos y de especie desarrollados previamente.

La normalidad de las muestras se analizó mediante los test Saphiro-Wilk y Kolmornov-Smirnov donde se comprobó que no seguían la normalidad. La comparación entre los grupos se realizó mediante el test Wilcoxon para cada una de las cirugías en estado pre y post operatorio, y la comparativa entre las cirugías se realizó mediante el test Mann-Withney. La correlación entre las diferentes PFAs se analizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación rho de Spearman. El nivel de significación se estableció para un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa GraphPrism 5.0.

3.8.2 Caracterización de los niveles de ITIH4 en perras afectadas por piometra

Animales y toma de muestra

Este estudio se llevó a cabo gracias a la colaboración establecida con el Dr Roman Dabrowski (University of Life Sciences, Lublin, Polonia), que nos ha proporcionado las muestras séricas y la información clínica de cada una de las perras incluidas en el estudio.

Se dispuso del suero de 25 perras de edades comprendidas entre 3 y 12 años, algunas de las cuales pertenecían a razas diferentes y otras eran animales mestizos. Las muestras sanguíneas fueron recogidas de la vena safena lateral, y centrifugadas a 3000g durante 30 min tras la formación del coágulo, para separar el suero. Los animales se dividieron en dos grupos: grupo control, formado por 14 animales sanos y grupo de estudio, formado por 11 animales afectados por piometra.

El grupo control consistió en 14 perras clínicamente sanas, que fueron admitidas para esterilización quirúrgica de elección (ovariohisterectomía). Todas las perras pertenecientes al grupo control estaban en anestro, según lo determinado por los datos del examen clínico y el examen citológico de los frotis vaginales.

Antes del diagnóstico preliminar de piometra, todas las perras clasificadas en el grupo de estudio se examinaron clínicamente y se realizaron pruebas adicionales. En la mayoría de los casos, el examen clínico reveló polidipsia, poliuria, falta de apetito (disminución o ausencia completa), deshidratación, apatía, vómitos y color anormal de las membranas mucosas como signos frecuentes de la enfermedad. La vaginoscopia mostró membranas serosas congestionadas del vestíbulo vaginal. La ecografía abdominal reveló un útero agrandado con contenido hipocogénico y un diámetro que osciló entre 3 y 7 cm. Se observaron quistes en los ovarios y se registró hiperplasia del endometrio. En base al examen clínico, las perras fueron clasificadas como animales afectados por piometra cerrada. Esto fue confirmado mediante el examen histopatológico postoperatorio del útero y los ovarios realizado en el Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Ciencias de la Vida, Lublin, Polonia.

Cuantificación y análisis estadístico

Las determinaciones de ITIH4 y Hp se realizaron mediante los ELISAs desarrollados, y la cuantificación de CRP mediante un ensayo inmunturbidimétrico. Las determinaciones de los parámetros clínicos fueron realizadas en la Universidad de Ciencias de la Vida, Lublin, Polonia.

Mediante los test Saphiro-Wilk y Kolmornov-Smirnov, se comprobó que las muestras no seguían una distribución normal. Las diferencias en los niveles de las PFAs y los valores clínicos entre el grupo de animales sanos y el grupo de animales afectados por piometra se analizaron mediante el test estadístico Mann-Whitney. El nivel de correlación existente entre los diferentes parámetros se estudió a partir del cálculo del valor del coeficiente de correlación de Spearman (Rho).

3.8.3 PFA en sueros e hígados de perros infectados con *L. infantum*.

Estudio 1.

Los dos estudios que se describen a continuación en los que se evalúa la respuesta de fase aguda en Beagles afectados de leishmaniosis, se llevaron a cabo en colaboración con el grupo del profesor Juan Antonio Castillo (Departamento de Patología Animal, Universidad de Zaragoza).

Animales

En un primer estudio se dispuso de muestras de suero y de muestras de hígado de 8 perros de la raza Beagle de una edad aproximada de 18 meses. Cinco de ellos, de los cuales 2 eran machos y tres hembras, habían sido infectados experimentalmente con *Leishmania infantum*. Tres animales (2 machos y una hembra) que no habían sido infectados se utilizaron como grupo control negativo.

Infección experimental y toma de muestra

La infección experimental se realizó con 1×10^8 promastigotes de *L. infantum*. Un año después de la infección experimental, tiempo considerado adecuado para que los animales hubieran desarrollado la enfermedad, se estableció el punto final del estudio y se procedió al examen clínico y a la toma de muestras analíticas. Las muestras de suero y de hígado extraídas de los perros se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo por el Departamento de Patología Animal, de la universidad de Zaragoza.

RT-qPCR

La expresión de la síntesis hepática de ITIH4 y CRP, se analizó mediante PCR a tiempo real (qPCR) en las muestras de hígados. Esta técnica está basada en el uso de fluorocromos que se intercalan en la molécula de DNA, de forma que a mayor número de copias de un fragmento durante la amplificación, mayor fluorescencia se registrará.

La extracción de RNA mensajero (mRNA) a partir de las muestras de hígado se realizó con el kit RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen). Una vez obtenido el mRNA, el DNA genómico se eliminó con el kit DNase Turbo (Ambion) y la retrotranscripción a cDNA se realizó con el kit Superscript Reverse Transcriptase II (Life Technologies). Todos los protocolos se realizaron según las especificaciones del fabricante. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en triplicado en un StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystem) utilizando el Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) y los cebadores correspondientes. (Tabla 6).

El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente: 20 segundos a 95°C para la activación, seguidos de 40 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a la T_m correspondiente para cada cebador. Al final de los cuarenta ciclos de cada reacción se realizó una curva de disociación para comprobar la especificidad de los cebadores. Los niveles de expresión génica se obtuvieron mediante cuantificación relativa. El factor de normalización para cada muestra se calculó

como la media geométrica de la expresión de dos genes normalizadores, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y β -2-microglobulina (β 2M).

Tabla 6. Secuencia de los cebadores (D) directo y (R) reverso diseñada para cada gen, tamaño del producto amplificado (pb) y temperatura de anillamiento (Tm).

Gen	Secuencia cebadores	pb	Tm (°C)
CRP	D: 5' AGACCTGGACGAAAAAGCCTT 3'	89	60
	R: 5' CCTTCATCGGCTTCTGCAACT 3'		
ITIH4	D: 5' CACATCCAATTCAAGCCGCA 3'	116	64
	R: 5' TCGATCTGAATGGAGCCTCCA 3'		
GADPH	D: 5' TGGCAAAGTGGATATTGTCG 3'		60
	R: 5' AGATGGACTTCCCGTTGATG 3'		
β2M	D: 5' TCTACATTGGGCACTGTGTAC 3'	136	60
	R: 5' AAGAGTTCAGGTCTGACCAAG 3'		

Los cebadores utilizados para amplificar la expresión de ITIH4 y CRP (sintetizados por InvitrogenTM) fueron diseñados en el laboratorio con la ayuda del programa Primer Express (software de Applied Biosystems). Las secuencias se obtuvieron en las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), USA. Dichas secuencias se localizaron en diferentes exones para evitar la amplificación de DNA genómico. Asimismo, se realizó una búsqueda BLAST en el genoma de perro para evitar la existencia de sitios de unión inespecífica de los cebadores. Los cebadores de los genes control GADPH (Zhang et al., 2013) y β -2-microglobulina (Kisiel et al., 2012) se seleccionaron según bibliografía ya publicada.

Cuantificación y análisis estadístico

La cuantificación de CRP, ITIH4, Hp y GPA, se realizó mediante inmunodifusión radial, utilizando los antisueros específicos y de especie desarrollados previamente.

Las diferencias en los niveles de las PFAs tanto en suero como en hígado entre el grupo de animales no infectados y el grupo de animales infectados se analizaron mediante el test estadístico Mann-Whitney.

3.8.4 Evolución de las PFAs en animales infectados con *L. infantum*. Estudio 2.

Animales y toma de muestra

En un segundo estudio, se dispuso del suero de 10 perros de raza Beagle, 5 machos y 5 hembras, todos ellos infectados experimentalmente con *L. infantum* de la misma forma que en el estudio anterior.

La toma de muestra y el examen clínico se realizaron a diferentes tiempos a lo largo del estudio. La muestra a tiempo 0 se obtuvo antes de la infección, una vez los animales hubieron pasado un periodo de aclimatación al centro. Tras la infección se recogieron muestras a diferentes tiempos para evaluar la evolución de las PFAs. Estos tiempos fueron: 24 h y 48 horas, 1 semana, y 2, 3, 4, 6, 8 y 10 meses post infección.

Diagnóstico serológico

Con el fin de valorar la presencia de anticuerpos frente a *Leishmania infantum* en los animales, se realizaron las técnicas serológicas IFI (inmunofluorescencia indirecta) y ELISA. Por otra parte, para la determinación de la carga parasitaria se realizó una PCR en tiempo real en los tejidos considerados habitualmente como diana, los linfonodos y la médula ósea. Estas técnicas fueron realizadas por el Departamento de Patología Animal, de la universidad de Zaragoza.

El ELISA comercial, CIVTEST Canis Leishmania 192 (HIPRA S.A.), se realizó de acuerdo a las instrucciones indicadas en el mismo. Las muestras de suero se analizaron por duplicado a una absorbancia de 450nm. Para la interpretación de los resultados se calculó el valor de razón (Rz) para cada muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Rz = \frac{A_{450nm} \text{ muestra}}{A_{450nm} \text{ control positivo}}$$

Una vez obtenidos los resultados, los criterios de corte para considerar a un animal como positivo, negativo o dudoso, se establecieron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del ELISA, en función del valor obtenido de Rz:

Negativo ELISA: < 0,9

Dudoso ELISA: 0,9-1,1

Positivo ELISA: > 1,1

En los casos en los que el ELISA presentó dudas, los resultados obtenidos de la titulación de anticuerpos mediante IFI, también permitió clasificar a los animales, de acuerdo a los siguientes valores:

Negativo IFI: <1/40

Positivo IFI: \geq 1/40

Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico se realizó mediante una hoja de registro de signos clínicos, individual para cada animal. En dicha hoja se registraron parámetros generales del animal como temperatura y peso, y signos clínicos específicos de leishmaniosis. Para cada animal se asignó una puntuación clínica (PC) obtenida como la suma de cada síntoma individual empleando el esquema de puntuaciones previamente descrito por Manna (Manna et al., 2009) y con las modificaciones adoptadas por el grupo de Enfermedades Metaxénicas de la Universidad de Zaragoza tal y como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7. Descripción de los signos clínicos establecidos en la exploración clínica para calcular la puntuación clínica de cada paciente.

Signos clínicos	Gradación
Pérdida de peso	0; 0% de pérdida, 1; <20 %, 2; >20 %
Síntomas oculares: conjuntivitis/uveítis	0; ausencia, 1; moderada, 2; grave
Síntomas cutáneos: alopecias/úlceras	0; ausencia, 1; moderada, 2; grave
Linfadenopatía	0 ausencia, 1 presencia
Mucosas anémicas	0 ausencia, 1 presencia
Onicogriposis	0 ausencia, 1 presencia
Atrofia del músculo temporal	0 ausencia, 1 presencia
Esplenomegalia a la palpación	0 ausencia, 1 presencia
Cualquier otro síntoma relacionado con la infección	0 ausencia, 1 presencia

Peris 2018

Tras registrar los signos clínicos los animales se agruparon en tres grupos en función de la cantidad de signos expresados, clasificación basada en Abranches (Abranches et al., 1991) y según las modificaciones de Molina (Molina et al., 1994).

Asintomáticos: ausencia de síntomas y signos clínicos debidos a la infección por *Leishmania*. En este grupo se descartó el aumento de tamaño moderado de linfonodos, así como casos de mucosas anémicas.

Oligosintomáticos: síntomas moderados, incluyendo dos signos clínicos, aumento de tamaño de los linfonodos junto con onicogriposis o alopecia /dermatitis exfoliativa.

Polisintomáticos: síntomas evidentes, incluyendo 3 o más signos de enfermedad.

Cuantificación y análisis estadístico

Las determinaciones de ITIH4 y Hp se realizaron mediante los ELISAs desarrollados, y la cuantificación de CRP mediante un ensayo inmunturbidimétrico.

Mediante los test Saphiro-Wilk y Kolmogórnov-Smirnov, se comprobó que las muestras no seguían la normalidad. Las diferencias entre los distintos tiempos para cada PFA se analizaron mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis, aplicando el post test Dunn. Las correlaciones entre los datos de sintomatología clínica, serología y PFAs se calcularon mediante el cálculo del valor del coeficiente de correlación Rho de Spearman.

3.8.5 Asignación de valores de PFAs en animales sanos

Animales

Para la asignación de valores de referencia para las PFA en animales sanos, se utilizaron 165 animales. 72 animales pertenecían a la raza Beagle de edad comprendida entre 6 y 12 meses, 37 machos y 35 hembras. El resto de animales 98, pertenecían a otras razas y también algunos de ellos eran mestizos. De estos animales 45 eran animales entregados a centros de protección (23 machos y 22 hembras) con edades comprendidas desde los 5 meses hasta los 10 años, 22 fueron donantes y el resto, fueron perras utilizadas como controles sanos en los estudios de ovariectomía y piometra, con edades comprendidas desde los 5 meses hasta los 13 años.

Los sueros de los perros Beagle fueron proporcionados por el grupo del profesor Juan Antonio Castillo.

Cuantificación y análisis estadístico

Las PFAs fueron cuantificadas por los métodos desarrollados en esta tesis, ELISA tipo sándwich para ITIH4 y Hp, IR para GPA, e inmunturbidimetría para CRP.

Se estudió la normalidad de las muestras mediante los test Saphiro-Wilk y Kolmogórnov-Smirnov. El cálculo del intervalo de referencia para cada una de las proteínas se realizó mediante los percentiles 3 – 97 %. Los análisis comparativos entre las poblaciones en función de la raza, edad y sexo se analizaron mediante el test Mann-Withney.

3.8.6 Evaluación de los niveles de PFA en perros alojados en Centros de Protección.

El estudio realizado en los Centros de Protección se llevó a cabo en colaboración con la Asociación Española de Veterinarios Municipales (AVEM) Consistió en la recogida de muestras de sangre de perros que fueron alojados en diferentes centros de protección distribuidos por la geografía española. En este estudio han colaborado un total de 11 Centros de Protección de diferentes comunidades autónomas. El estudio fue aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal (PI56/15).

Animales y toma de muestra

Se obtuvo el suero de 61 perros de diferentes razas y edades comprendidas entre los 2 meses y los 10 años, que fueron recogidos en tres centros de protección de diferentes áreas geográficas de España. La toma de muestra se realizó a diferentes tiempos, una primera en el momento de la llegada del animal al centro, otra a los 2 ó 3 días de permanencia en el centro, una tercera a los 15 días y la última tras un mes de permanencia en el centro. En algunos casos no fue posible obtener las muestras de los últimos tiempos debido a la salida del animal del centro por causas adoptivas.

En los centros en los que no fue posible la recogida de muestras seriadas, se recogieron muestras de los animales que llegaban a los centros de protección y también de otros animales que llevaban un tiempo alojados en los mismos.

Para cada animal se completó una ficha con datos como edad, sexo, peso, estado sanitario y nutricional o si son animales recogidos o entregados entre

otros. El modelo de la ficha a rellenar para cada animal puede verse en el Anexo Figura 1.

Cuantificación y Análisis estadístico

Las determinaciones de ITIH4 y Hp se realizaron mediante los ELISAs desarrollados, y la cuantificación de CRP mediante un ensayo inmunturbidimétrico.

Se comprobó que las muestras no seguían la normalidad mediante los test Saphiro-Wilk y Kolmogórnov-Smirnov para cada una de las PFAs estudiadas. Debido a que no se pudo asumir la normalidad de las muestras, las pruebas de contrasten con los valores medios de las PFAs se realizaron con el test Kruskall-Wallis cuando el factor tiene más de dos niveles, y Mann-Withney cuando el factor tiene dos niveles, y cuando Kruskall-Wallis ha salido significativo en los factores de más de dos niveles para contrastar los grupos dos a dos.

4 RESULTADOS

Resultados

4.1 Purificación de proteínas y obtención de antisueros

4.1.1 Purificación de ITIH4 canina y obtención de antisueros

La purificación de la proteína ITIH4 se ha llevado a cabo de manera satisfactoria en una sola etapa, mediante cromatografía de afinidad, utilizando anticuerpos anti ITIH4 porcina/Pig-MAP que reconocen la proteína homóloga canina. En una etapa previa, se comprobó la reactividad cruzada existente entre la ITIH4 canina y los antisueros anti Pig-MAP disponibles en nuestro laboratorio (Gonzalez-Ramon et al., 1995). Para el aislamiento de anticuerpos anti Pig-MAP, se preparó una columna de afinidad que contenía Pig-MAP purificada unida covalentemente a Sepharose 4B (Sigma). Los anticuerpos anti Pig-MAP se inmovilizaron en una columna de NHS-HiTrap (apartado 3.6.2.2) para preparar la columna de afinidad, que fue utilizada para la purificación de la proteína ITIH4 canina.

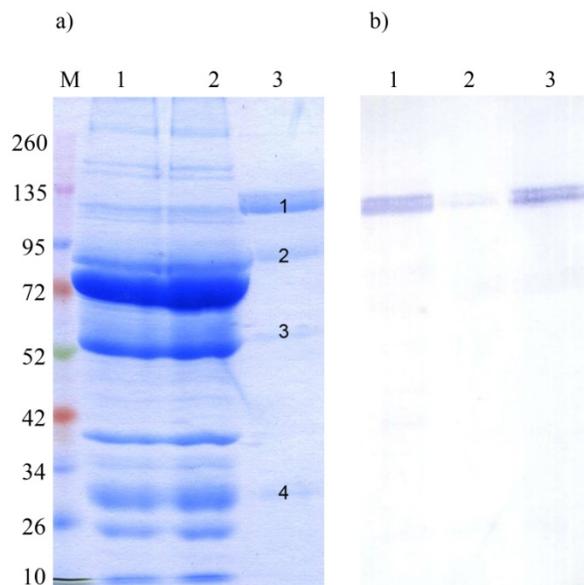


Figura 4. Análisis por SDS-PAGE (10 %) de las fracciones obtenidas durante la purificación de la ITIH4 canina. a) Tinción de proteínas con azul de Coomassie. M, marcadores de peso molecular (Sigma); 1, suero de perro de fase aguda utilizado como

Resultados

material de partida; 2, proteínas excluidas de la columna de afinidad con anticuerpos anti Pig-MAP; 3, ITIH4 canina purificada (proteína eluida de la columna de afinidad). Los números de 1 a 4 en carril 3 señalan las bandas identificadas mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS en el Anexo Tabla 1. b) Western Blot de las mismas muestras 1, 2, y 3 analizadas en (a). Se utilizó el antisuero anti ITIH4 canina específico (1:2000) como anticuerpo primario y anti IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina (Sigma, dilución 1:10000) como anticuerpo secundario.

El análisis mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 4 a) de la preparación de ITIH4 obtenida tras el proceso de purificación, mostró una banda principal de 120 KDa. El análisis mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS (Anexo Tabla 1) permitió identificar esta proteína como ITIH4 canina. La preparación de ITIH4 canina se obtuvo con una pureza superior al 75 %. El resto de bandas que aparecen en el gel de electroforesis fueron identificadas como albúmina, e inmunoglobulinas (Anexo Tabla 1).

La preparación de ITIH4 obtenida se utilizó para inmunizar conejos, lo que permitió obtener antisueros específicos anti ITIH4 canina, tras adsorber las inespecificidades de estos. Para ello se utilizó un inmunoadsorbente preparado a partir de un suero de perro al que se le había eliminado previamente la ITIH4 canina (excluido de la columna de afinidad con anticuerpos anti Pig-MAP). El análisis mediante inmunolectroforesis (Figura 5) muestra la efectividad de la inmunoadsorción. Como puede apreciarse en la Figura 5, el antisuero adsorbido (Af) muestra un solo arco de precipitación cuando se enfrenta tanto a la ITIH4 purificada (P) como a un suero de perro (S), a diferencia del antisuero inicial (Ai), que no es específico y reconoce otras proteínas además de la ITIH4. En la figura 5b, se muestra la especificidad de estos antisueros analizados mediante western blot, en las muestras obtenidas durante la purificación de la ITIH4. Mediante esta técnica el antisuero solo reconoce una banda a 120 KDa correspondiente a la ITIH4, tanto en la proteína purificada como en el suero de partida.

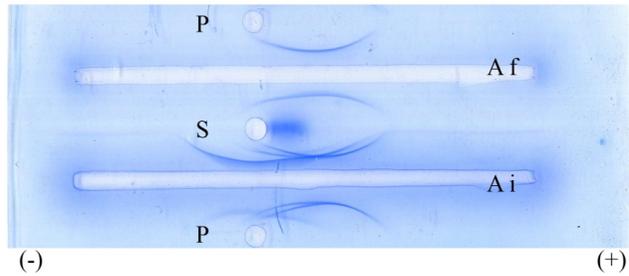


Figura 5. Análisis por inmunolectroforesis de los antisueros anti ITIH4. S, suero de perro; P, ITIH4 canina purificada. Canales: Ai, antisuero anti ITIH4 canina sin adsorber; Af, antisuero anti ITIH4 canina adsorbido.

4.1.2 Purificación CRP canina y obtención de antisueros.

La CRP canina se purificó en una sola etapa mediante cromatografía de afinidad con fosforil colina, como se ha descrito previamente para la purificación de CRP humana (Volanakis et al., 1978). El análisis mediante SDS PAGE (Figura 6) de la proteína aislada, mostró dos bandas de la misma intensidad, que se corresponden con los pesos moleculares descritos en la literatura para la CRP canina, 28 y 24 KDa aproximadamente (Caspí et al., 1984). Ambas bandas fueron identificadas como CRP canina mediante MALDI TOF (Tabla 1 Anexos).

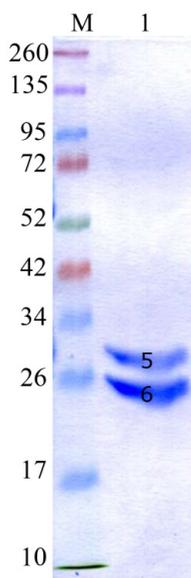


Figura 6. Análisis por SDS PAGE 12 % de la CRP canina. 1, CRP de perro purificada teñida con azul de Coomasie. Números 5 y 6 en el carril 1 corresponden al número de banda asignado para la identificación mediante MALDI TOF en la tabla anexo 1. M, marcadores de peso molecular (Sigma).

La inmunización de conejos con la CRP canina purificada, proporcionó antisueros que reconocían a dicha proteína, pero también a otras proteínas del suero de perro. La inmuoadsorción de estos antisueros con un suero de perro con baja concentración de CRP, insolubilizado con glutaraldehído (método de Avrameas), permitió la obtención de un antisuero anti CRP canina específico (Figura 7). Aunque el antisuero reacciona con la proteína purificada, debido a la baja concentración de la CRP en el suero de perro (<100 mg/L) y a la sensibilidad de la técnica, no fue posible visualizar a esta proteína en una muestra de suero mediante inmunoelectroforesis. Sin embargo permitió comprobar la especificidad del mismo, puesto que el antisuero adsorbido no mostró ningún arco de precipitación frente al suero de perro. El antisuero anti CRP adsorbido reconoce de la misma forma a las dos bandas de la CRP purificada, y las presentes tanto en un suero de perro normal como en un suero de perro de fase aguda por western blot (Figura 7 b).

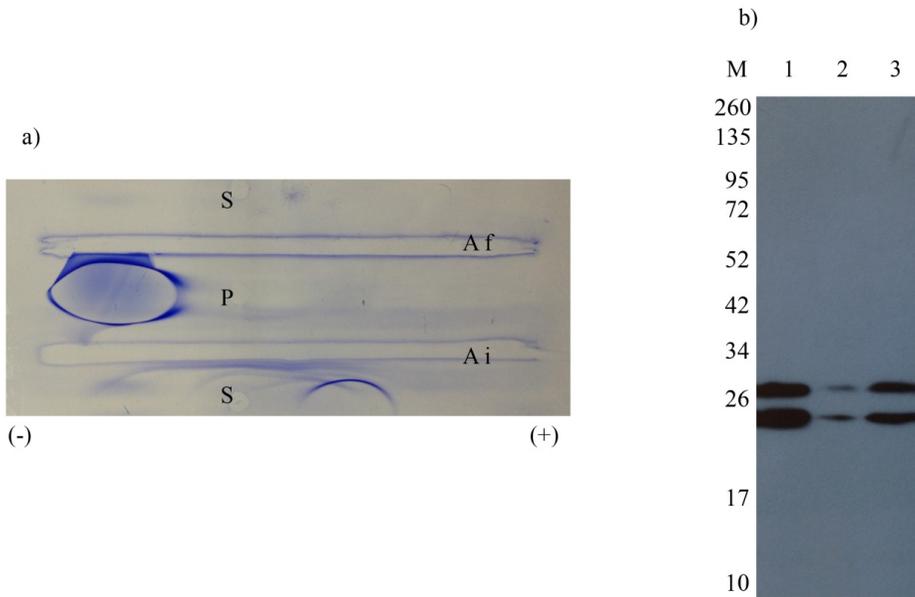


Figura 7. Caracterización del antisuero anti CRP de perro desarrollado. a) Análisis por Inmunolectroforesis: S, suero de perro de fase aguda; P, CRP purificada. Canales: Ai, antisuero anti CRP de perro sin adsorber; Af, antisuero anti CRP de perro adsorbido. b) Western blot: 1, CRP de perro purificada; 2, suero de perro sano; 3, suero de perro de fase aguda. M, marcadores de peso molecular. Se utilizó antisuero anti CRP de perro adsorbido (dilución 1:5000) como anticuerpo primario y anti IgG de conejo unido a peroxidasa (Sigma 1:20000), como anticuerpo secundario (revelado quimioluminiscente).

4.1.3 Purificación de haptoglobina canina y obtención de antisueros.

La purificación de haptoglobina (Hp) se inició con una etapa de precipitación fraccionada del suero de perro con sulfato amónico saturado (ssa). Previamente se realizó un estudio para determinar los porcentajes de saturación del ssa a los que se producía la precipitación de la Hp canina.

Mediante análisis por SDS-PAGE de las fracciones precipitadas (Figura 8a) se identificó una banda a 35 KDa aproximadamente, concentrada en las fracciones de precipitación del 50-60% y del 60-70% de saturación de sulfato amónico. Dicha banda parecía coincidir con los pesos moleculares descritos en la literatura para la Hp canina, que eran de 34 KDa para la subunidad pesada y 18

Resultados

KDa para la subunidad ligera (Kumazaki et al., 1992). Posteriormente la Hp fue identificada en esas fracciones mediante western blot (Figura 8b), utilizando anticuerpos anti Hp porcina disponibles en el laboratorio (Lampreave et al., 1994; Martin De La Fuente et al., 2010), que presentaban reactividad cruzada con la proteína homóloga canina. De esta manera se pudo determinar que la Hp canina precipitaba en un rango de 50-70 % de saturación de sulfato amónico. El antisuero de cerdo utilizado, sin embargo, no reconocía a la subunidad ligera de la Hp canina.

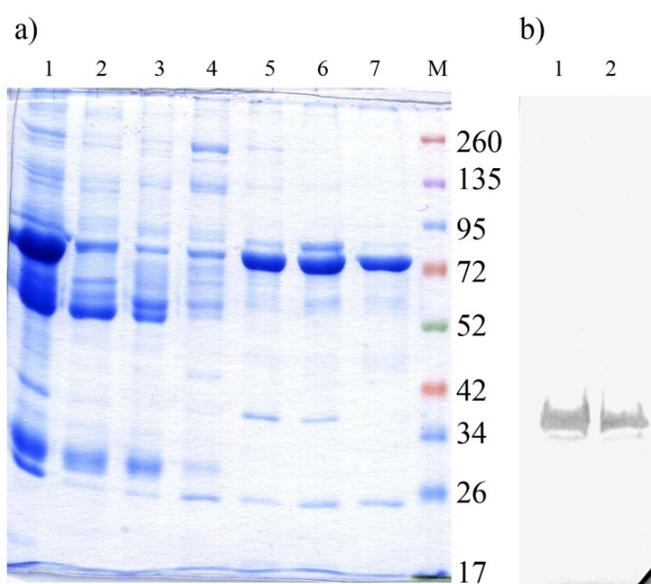


Figura 8. Análisis de las fracciones de suero de perro precipitadas con sulfato amónico saturado (ssa). a) SDS-PAGE (10 %): 1; suero de perro de partida, 2; fracción de proteínas precipitadas al 30% de ssa, 3; fracción precipitada del 30-40%, 4; fracción precipitada del 40-50 %, 5; fracción precipitada del 50-60%, 6; fracción precipitada del 60-70 %, 7; sobrenadante al 70% de ssa, M; marcadores de peso molecular (Sigma). b) Western blot: 1, fracción precipitada del 50-60 %; 2, fracción precipitada del 60-70 %. Se utilizó un antisuero anti Hp porcina (dilución 1/1000) como anticuerpo primario y anti IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina (dilución 1/10000) como anticuerpo secundario.

Como puede verse en la Figura 8a, la fracción enriquecida en Hp, también contenía otras proteínas séricas, como la que aparece a una altura de 72 KDa,

que corresponde a la principal proteína del suero, la albúmina. Parte de la albúmina presente en la fracción se eliminó mediante una columna de Azul de Cibacrom – Sepharose 4B. En esta columna la albúmina queda retenida en la matriz mientras que la Hp no interacciona con el Azul de Cibacrom y es excluida durante el lavado de la columna. Aunque no se eliminó la totalidad de la albúmina, la proporción de Hp presente en esta fracción respecto a la concentración de albúmina, aumentó significativamente en esta etapa (Figura 10 carril 3).

La última etapa de purificación consistió en una cromatografía en Sephacryl S-200. La Hp, que tiene un peso molecular alrededor de 100 KDa en condiciones nativas, se eluyó en el primer pico cromatográfico (Figura 9,a). Las fracciones que contenían la proteína de interés (fracciones de la 1 a la 10 figura 9 b) se reunieron y tras un segundo ciclo de purificación con la columna de Sephacryl S-200 la preparación final se concentró hasta 2 mg/mL. Esta preparación final fue identificada como Hp de perro mediante MALDI-TOF (Figura 10, Anexo Tabla 1)

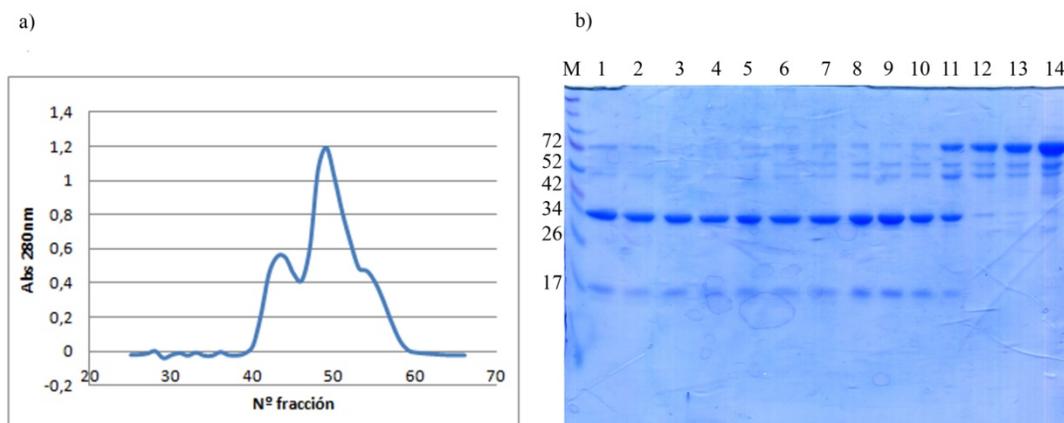


Figura 9. Cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-200). En la columna se aplicó la fracción enriquecida en Hp que se obtuvo tras la segunda etapa de purificación (columna de Azul de Cibacrom – Sepharose). a) Perfil de elución de las fracciones de la cromatografía. b) Análisis por SDS-PAGE 12 % de las fracciones obtenidas en el primer y segundo pico de elución.

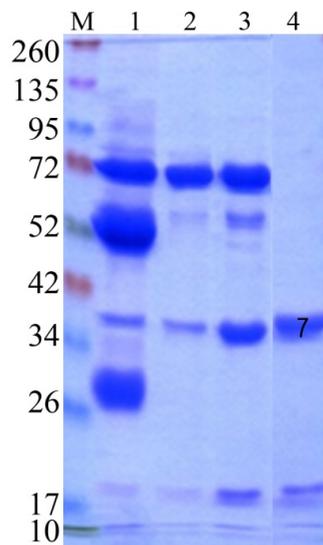


Figura 10. Análisis mediante SDS-PAGE (12 %) de las fracciones obtenidas durante las diferentes etapas del proceso de purificación de Hp de perro. 1, Suero de perro de partida; 2, Fracción seleccionada tras la precipitación fraccionada con ssa; 3, Fracción obtenida tras la cromatografía en Azul de Cibacrón – Sepharose 4B (excluido); 4, Fracción final de Hp de perro obtenida tras las dos etapas de filtración en Sephacryl S-200.

La Hp purificada se utilizó para inmunizar conejos, lo que permitió obtener un antisuero que al ser enfrentado por inmunolectroforesis al suero de perro producía una banda principal, que correspondía a la Hp, pero también otras líneas más débiles (ver Figura 11a). Para eliminar estas inespecificidades se preparó un inmunoadsorbente con las fracciones de suero de perro carentes de Hp, obtenidas durante el proceso de purificación. Después de la inmunoadsorción, el antisuero anti Hp reaccionó de manera específica con la Hp de perro mediante inmunolectroforesis (Figura 11a), reconociendo por igual, tanto a la proteína purificada, como la Hp presente en el suero de perro. La especificidad del antisuero anti Hp obtenido puede apreciarse también al utilizarlo para el revelado de suero de perro mediante SDS-PAGE al 12 % y Western blot. Como puede apreciarse en la Figura 11 b, el antisuero reconoce una sola banda que corresponde con la cadena pesada de la Hp.

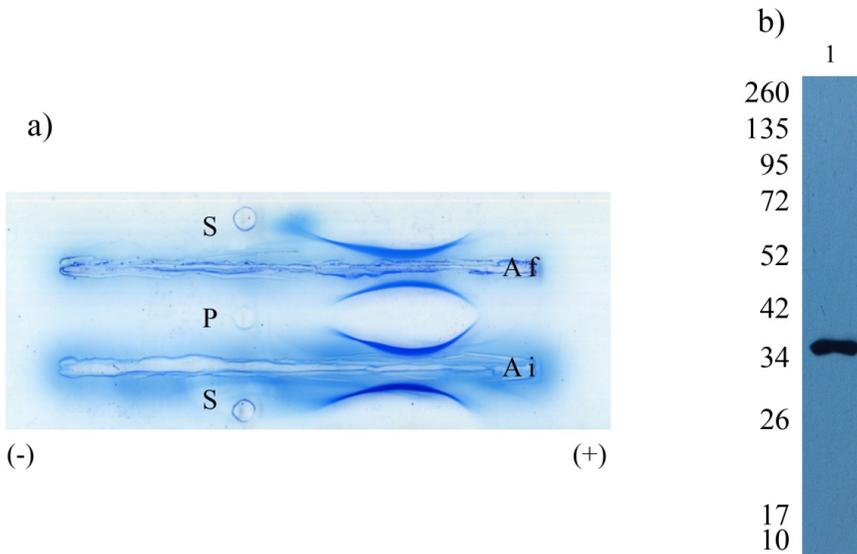


Figura 11. Análisis por inmunolectroforesis (a) y por Western blot (b) del antisuero anti Hp de perro desarrollado a) S, suero de perro; P Hp canina purificada. Canales: antisuero anti Hp canina antes (Ai) y después de adsorber (Af). b) Western blot de suero de perro, revelado con el antisuero anti Hp de perro específico (1/5000) y anti IgG de conejo unida a peroxidasa (1/20000).

4.1.4 Purificación de α_1 glicoproteína ácida canina y obtención de antisueros.

La purificación de la α_1 glicoproteína ácida (GPA), se llevó a cabo mediante un procedimiento de dos etapas. En una primera etapa, la adición de una mezcla de sulfato amónico y ácido tricloroacético al suero de perro, permitió separar una proteína que mostró una banda de 44 KDa mediante SDS PAGE, (Figura 12 carril 2) del resto de las proteínas del suero mediante precipitación de estas últimas. Esta banda que permanece en la fracción del sobrenadante, coincide con el peso molecular descrito para la GPA de perro. En una segunda etapa se aumentó el grado de pureza de esta proteína haciendo pasar dicho sobrenadante por una columna de intercambio catiónico (columna de amberlita IRC-50) en la que la GPA debido a su bajo pI no se fija a la matriz. La proteína que no se unió a la matriz de amberlita fue dializada frente a PBS y concentrada hasta

Resultados

aproximadamente 2 mg/mL. Dicha proteína fue identificada como GPA de perro mediante MALDI-TOF (Tabla 1 Anexos).

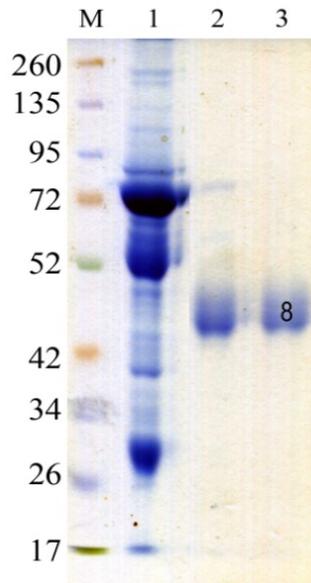


Figura 12. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación de GPA. Carril 1, suero de perro; carril 2, sobrenadante de la precipitación con ácido tricloroacético y sulfato amónico, que contiene la GPA; carril 3, excluido de la columna de amberlita que contiene la GPA de perro purificada, el número 8 de este carril indica la banda recortada y analizada mediante MALDI TOF en la tabla 1 del Anexo. M, peso molecular (Sigma).

La inmunización de esta proteína purificada en conejos permitió obtener un antisuero anti GPA, que reconoce por igual a la proteína purificada y a la GPA presente en el suero de perro mediante inmunoelectroforesis (Figura 13). Estos antisuecos no mostraron ninguna banda adicional al enfrentarlos al suero de perro, por lo que la especificidad mostrada por inmunoelectroforesis se consideró adecuada y no fue necesario someterlos a inmunoadsorción.

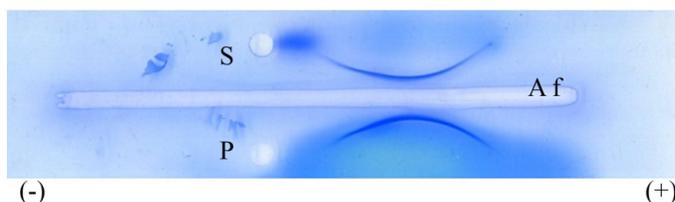


Figura 13. Análisis por inmunoelectroforesis del antisuero anti GPA canino. S, suero de perro; P GPA canina purificada. En el canal, antisuero anti GPA canina (A f).

4.2 Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de PFAs caninas

4.2.1 Desarrollo y validación de métodos de inmunodifusión radial para la cuantificación de ITIH4, CRP, Hp y GPA caninas

A partir de los antisueros específicos desarrollados, y como método de medida inicial para la cuantificación de ITIH4 canina, se puso a punto la técnica de inmunodifusión radial (IR). A su vez, también se puso a punto la misma metodología para la cuantificación de CRP, Hp y GPA, a partir de los antisueros previamente desarrollados.

Las proteínas purificadas (ITIH4, CRP, Hp y GPA) se utilizaron como patrón para asignar el valor de referencia a un suero de perro, que posteriormente se utilizó como calibrador en los respectivos métodos de IR. Se realizó una validación inicial del método determinando la precisión, rango de linealidad y límite de cuantificación. En las figuras 15, 16, 17 y 18, se muestra un resumen con los principales parámetros calculados para cada uno de los métodos de IR desarrollados y validados.

El rango de trabajo se seleccionó mediante la elección del rango lineal que presentó la curva dosis-respuesta del calibrador. A modo de ejemplo se muestra en la figura 14, la curva dosis-respuesta del calibrador para la cuantificación de ITIH4 canina. Como puede verse, a concentraciones por encima de 0,28 mg/mL

de ITIH4 la curva del calibrador satura, mientras que por debajo de 0,017 mg/mL el diámetro del halo de precipitación es muy pequeño y no hay diferencias entre las distintas concentraciones. La selección del rango de trabajo se efectuó de la misma manera para el resto de proteínas (CRP, Hp, GPA); estos valores pueden verse en las figuras 15 a 18, rango lineal.

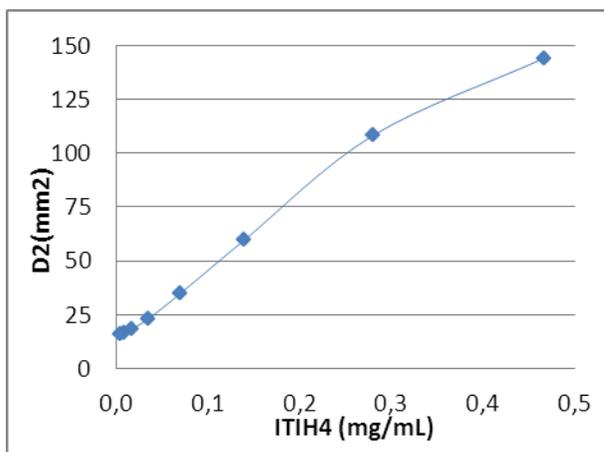


Figura 14. Curva dosis-respuesta del calibrador para cuantificación de ITIH4 canina por IR. Se representa el diámetro al cuadrado del halo de precipitación (expresado en mm²), frente a la concentración de ITIH4 en mg/mL.

Se evaluó la veracidad del ensayo comparando la curva dosis-respuesta obtenida con la proteína purificada y un suero de perro de alta concentración de la proteína de interés. Para ello se prepararon diluciones seriadas del suero canino y se comparó el valor obtenido en el ensayo con el teórico, calculado a partir del valor de la muestra sin diluir y el factor de dilución. Los valores de concentración obtenidos para cada una de las diluciones no difieren más del 10 % de los valores teóricos (datos no mostrados), sin que se observe desviación de la linealidad en el rango de trabajo del ensayo, para ninguno de los cuatro métodos de IR desarrollados (Figuras 15 a 18, Linealidad).

El límite de cuantificación (LoQ) se determinó mediante la dilución de un suero de perro de baja concentración de la PFA correspondiente. Se realizaron

Resultados

diluciones de concentraciones decrecientes de analito y se analizaron por quintuplicado en el mismo gel. El límite de cuantificación se estableció para el mínimo valor de concentración que cumpliera con estos dos parámetros: un CV menor del 10 % y un porcentaje de error en la cuantificación inferior al 5 % respecto de su valor teórico. El límite de cuantificación utilizando el antisuero anti ITIH4 canino específico al 2% en el gel, fue de 0,022 mg/mL de ITIH4. Los sueros se aplicaron al gel diluidos 1:5, por lo que la mínima cantidad de ITIH4 en suero que puede cuantificarse en las condiciones analíticas seleccionadas es de 0,11 mg/mL. En las figuras 15, 16, 17 y 18, se recogen los LoQ determinados para las diferentes PFA.

El estudio de la precisión de los métodos de IR se realizó mediante el cálculo de los coeficientes de variación (CV) intra (n=5) e inter (n=6) ensayo para tres sueros de perro con diferentes concentraciones del analito correspondiente (alta, media y baja). Los resultados de los ensayos mostraron una baja imprecisión para los métodos de IR desarrollados, siendo los CV, menores del 7 % para la ITIH4, menores del 8 % para la CRP, menores del 6 % para la Hp y del 5 % para la GPA (Figuras 15 a 18, precisión). En todos ellos, salvo para la muestra de alta concentración de CRP, el CV intra ensayo fue inferior al 5 %.

Resultados

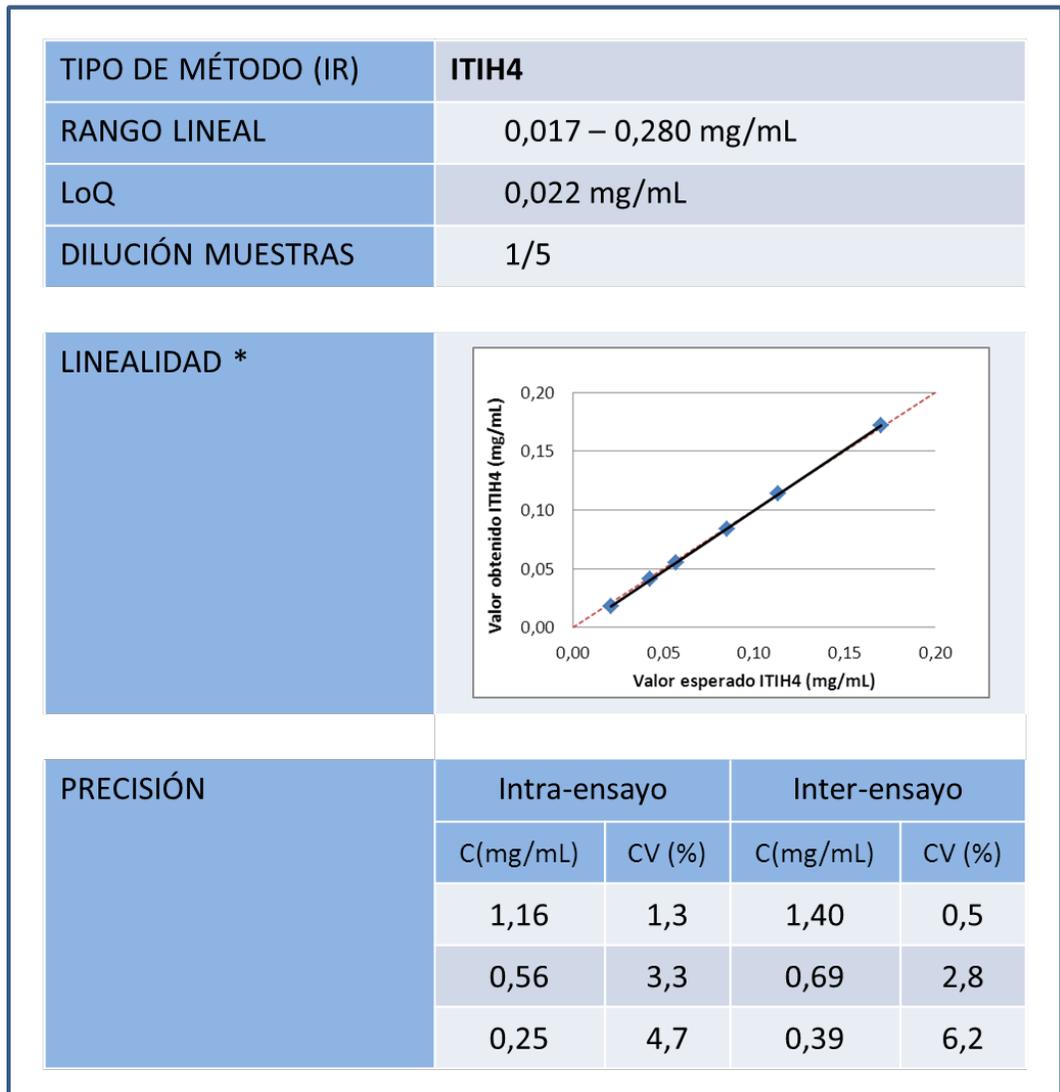


Figura 15. Principales parámetros determinados en los estudios de validación del método de IR para la cuantificación de la ITIH4 canina. * Linealidad: Linealidad con la dilución, se representa el valor el valor determinado para las diferentes diluciones del suero de perro frente al valor esperado teóricamente (valor calculado a partir del valor del suero sin diluir y el factor de dilución). La línea negra representa el ajuste mediante mínimos cuadrados de los puntos y la línea roja discontinua la igualdad $y=x$.

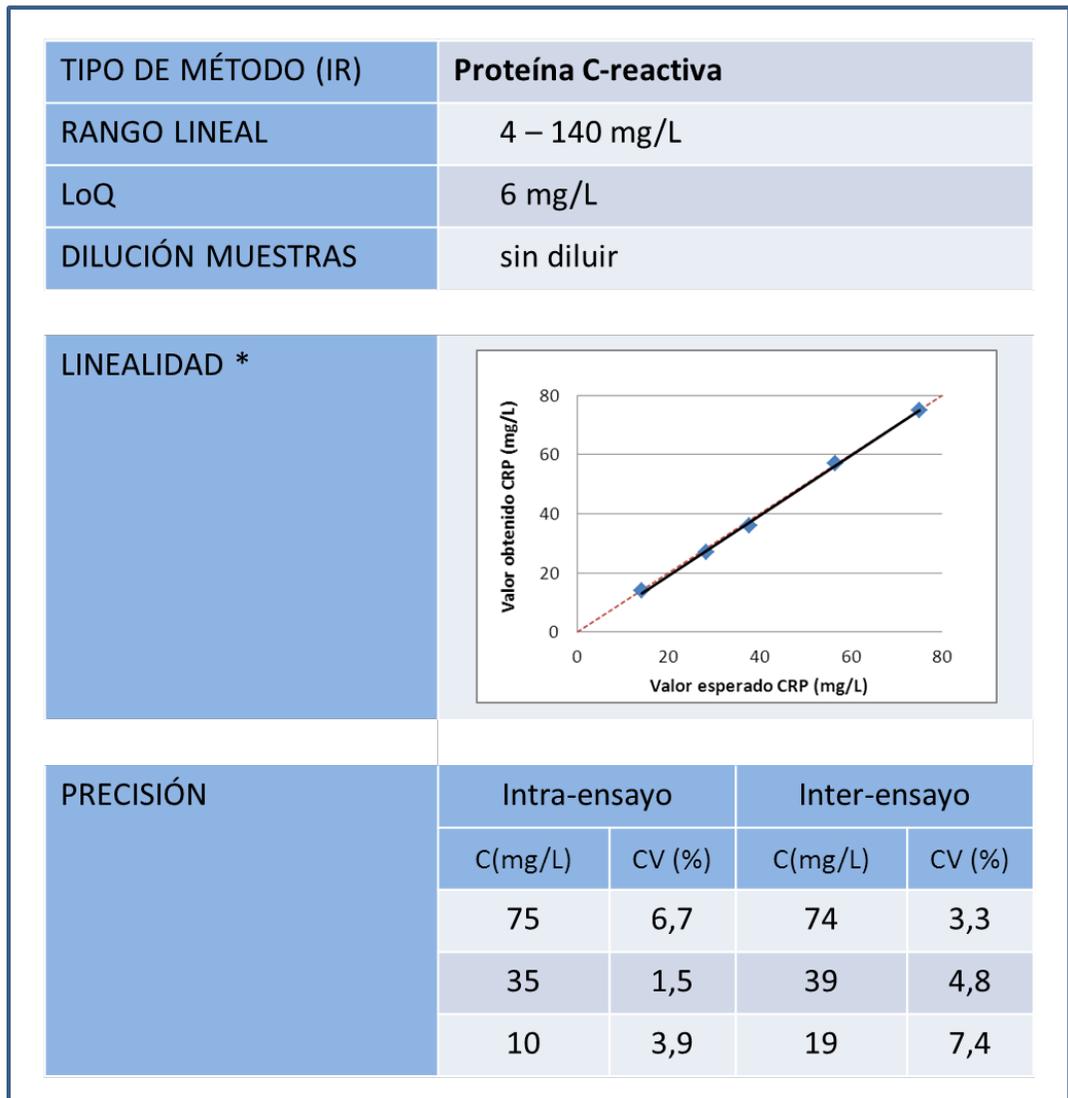


Figura 16. Principales parámetros determinados en los estudios de validación del método de IR para la cuantificación de la CRP canina. * Linealidad: Linealidad con la dilución, se representa el valor el valor determinado para las diferentes diluciones del suero de perro frente al valor esperado teóricamente (valor calculado a partir del valor del suero sin diluir y el factor de dilución). La línea negra representa el ajuste mediante mínimos cuadrados de los puntos y la línea roja discontinua la igualdad $y=x$.

Resultados

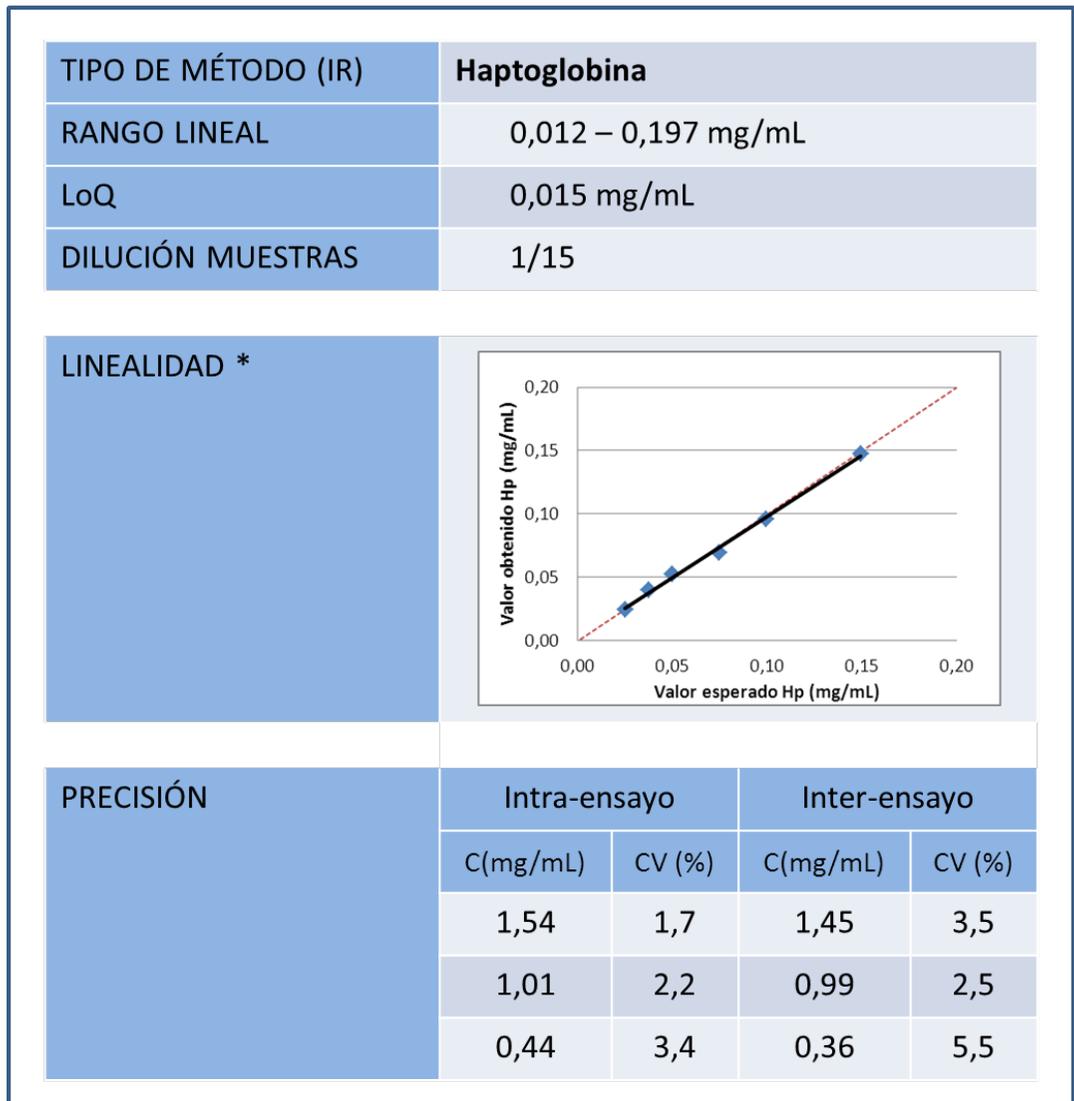


Figura 17. Principales parámetros determinados en los estudios de validación del método de IR para la cuantificación de la Hp canina. * Linealidad: Linealidad con la dilución, se representa el valor el valor determinado para las diferentes diluciones del suero de perro frente al valor esperado teóricamente (valor calculado a partir del valor del suero sin diluir y el factor de dilución). La línea negra representa el ajuste mediante mínimos cuadrados de los puntos y la línea roja discontinua la igualdad $y=x$.

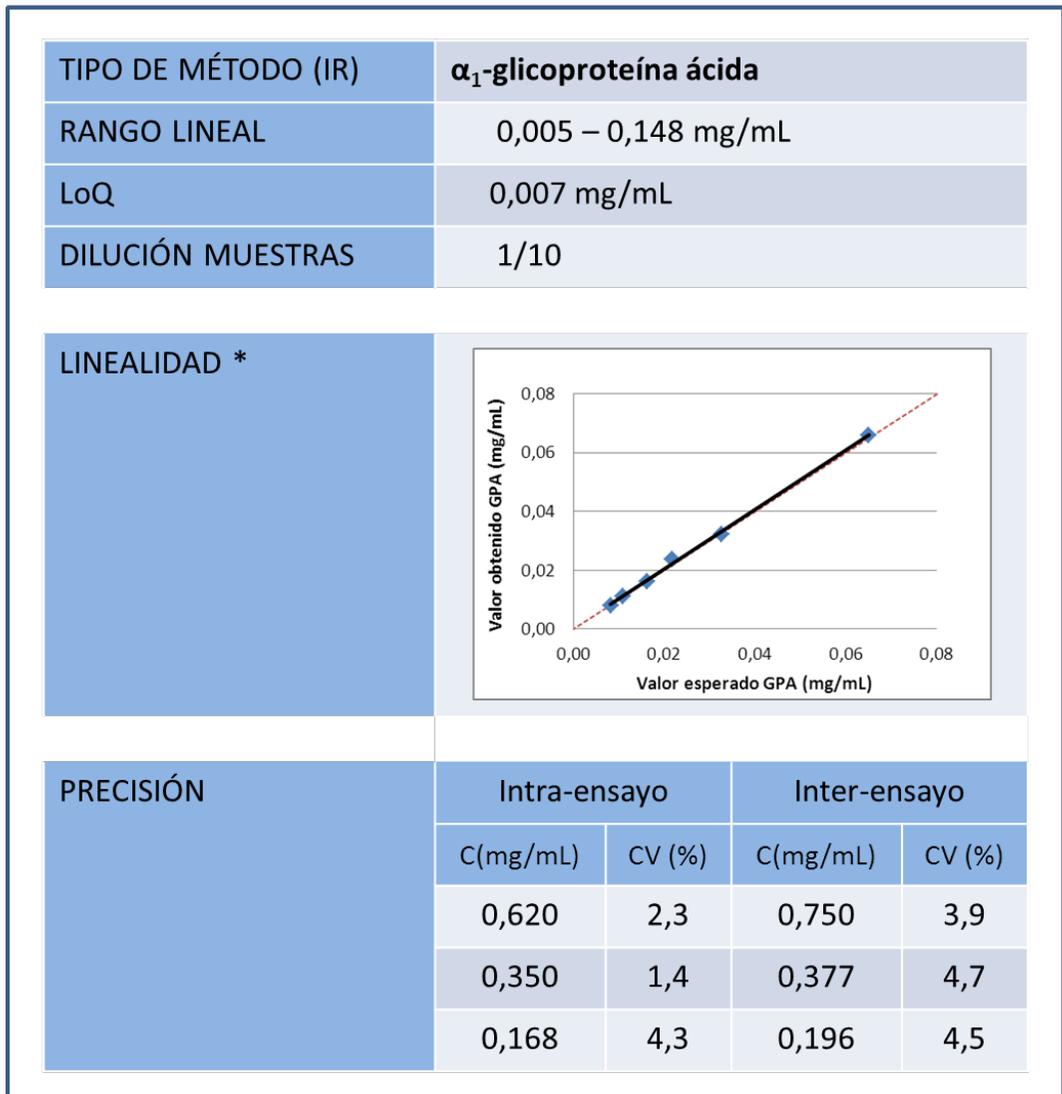


Figura 18. Principales parámetros determinados en los estudios de validación del método de IR para la cuantificación de la GPA canina. * Linealidad: Linealidad con la dilución, se representa el valor el valor determinado para las diferentes diluciones del suero de perro frente al valor esperado teóricamente (valor calculado a partir del valor del suero sin diluir y el factor de dilución). La línea negra representa el ajuste mediante mínimos cuadrados de los puntos y la línea roja discontinua la igualdad $y=x$.

4.2.2 Desarrollo y validación de un ELISA para la determinación de ITIH4 canina

Se ha desarrollado un ELISA tipo sándwich para la cuantificación de ITIH4 canina, a partir de los anticuerpos desarrollados en conejo (apartado 3.6.1). Los anticuerpos anti ITIH4 canina se inmunopurificaron a partir del antisuero específico mediante cromatografía de afinidad con ITIH4 canina fijada a Sepharose 4B (apartado 3.6.3.1). Parte de los anticuerpos se marcaron con peroxidasa para utilizarse como anticuerpo de revelado (apartado 3.6.3.2).

Para el desarrollo y optimización del ELISA se probaron diferentes concentraciones de anticuerpo de captura (fijado a la placa) y de revelado (marcado con peroxidasa), tiempos de incubación, tampones de reacción, condiciones de bloqueo de los pocillos, etc. Las condiciones finalmente seleccionadas se recogen en el apartado 3.6.5.2 de materiales y métodos. Una vez puestas a punto las condiciones analíticas se realizó una validación del método utilizando procedimientos estandarizados. Se determinaron los límites de detección y cuantificación, se evaluó la precisión, la linealidad y se realizó una comparativa de métodos con la IR, utilizada como método de referencia.

La medida repetida 16 veces en un mismo ensayo de una muestra de blanco carente de analito, permitió determinar el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) del ensayo, a partir de la media + 3 SD (LoD) y la media + 10 SD (LoQ), respectivamente. Los límites de detección y cuantificación fueron de 6 ng/mL y 20 ng/mL, respectivamente.

De acuerdo con el LoQ y el límite superior de linealidad de la curva de calibrado se ha establecido un rango analítico de 21-700 ng/mL (concentración de ITIH4 en las muestras añadidas al pocillo, es decir, diluidas). Las muestras de suero de perro han de diluirse 1:4000 para analizarse mediante este método. Estas condiciones analíticas nos permiten cuantificar ITIH4 en muestras de suero de perro con valores en el rango comprendido entre 0,08 y 2,8 mg/mL de ITIH4.

Resultados

La precisión del ELISA se evaluó a partir de las medidas de tres sueros de perro con diferentes concentraciones de ITIH4 (alta, media y baja). Como puede verse en la tabla 8, los CV intra-ensayo (n=10) fueron inferiores al 6 % y los CV inter-ensayo (n=10) inferiores al 7 %.

Tabla 8. Estudio de la precisión del ELISA de la ITIH4 canina. Se muestran los CV intra-ensayo (n=10) e inter-ensayo (n=10) obtenidos para tres muestras de suero de perro con diferentes concentraciones de ITIH4.

Conc (mg/mL)	CV (%) intra ensayo	CV (%) inter ensayo
1,513	5,1	4,3
0,823	4,7	6,7
0,221	5,3	6,5

Se ha evaluado la linealidad del ensayo a partir de un suero de perro de alta concentración de ITIH4 (1,32 mg/mL). Se prepararon diluciones seriadas del suero de alta concentración que se analizaron por duplicado. Los valores obtenidos se compararon con los valores teóricos calculados a partir del valor de la muestra sin diluir y del factor de dilución. Los resultados no mostraron desviación de la linealidad en el rango analítico (Figura 19).

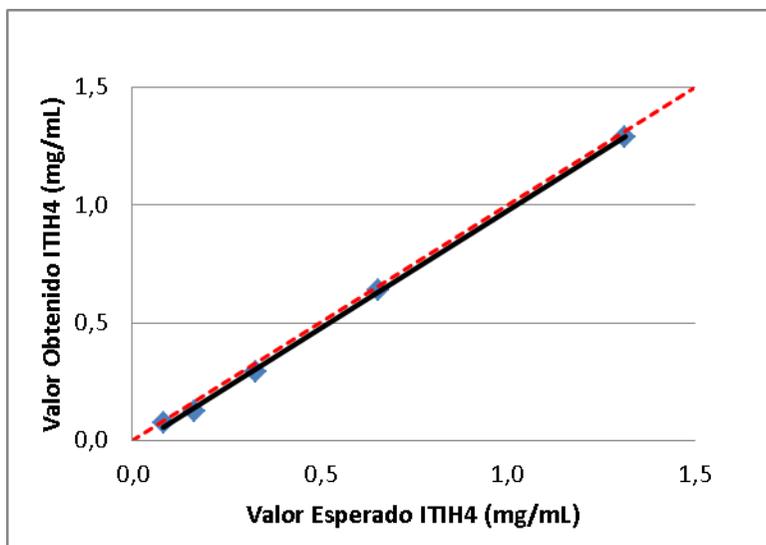


Figura 19. Estudio de la linealidad mediante dilución de un suero de perro de concentración conocida. La línea negra corresponde al ajuste por mínimos cuadrados de los valores obtenidos en el ensayo, representados frente a los valores esperados (valor calculado a partir del valor de la muestra sin diluir y el factor de dilución). La línea roja representa $y=x$.

En la figura 20, se muestra la comparación de los valores obtenidos para las muestras de suero de perro analizadas por ELISA y por inmunodifusión radial. Se analizaron 40 muestras de sueros por duplicado, por ambos métodos. Los valores obtenidos se analizaron mediante regresión lineal, observándose una buena correlación entre ambos métodos ($R=0,9829$). La recta obtenida para dicho ajuste fue la siguiente:

$$\text{ITIH4}_{\text{ELISA}} \text{ (mg/mL)} = 0,9399x \text{ ITIH4}_{\text{IR}} \text{ (mg/mL)} + 0,0589$$

El intervalo de confianza de la pendiente al 95 % estuvo comprendido entre 0,880 – 1,000 y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen entre 0,009 – 0,108 mg/mL. Por lo tanto la pendiente no difiere de uno, por lo que no existe un error proporcional, y la ordenada en el origen es muy próxima a cero, siendo la diferencia irrelevante desde el punto de vista analítico.

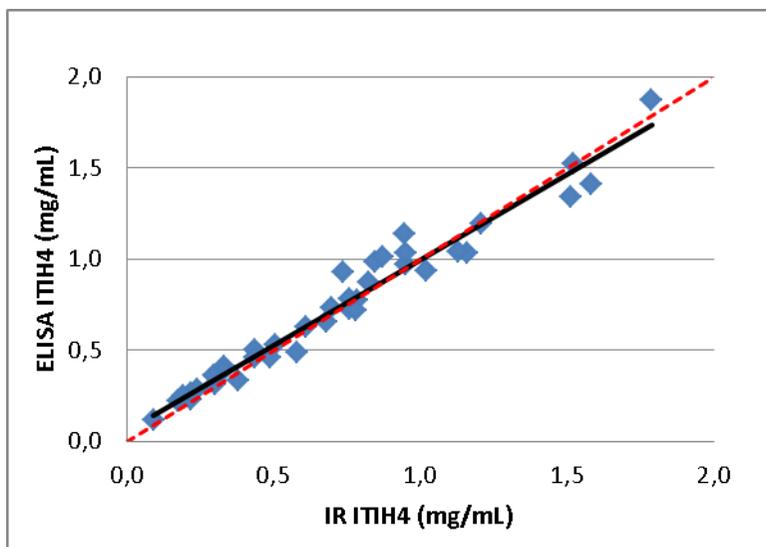


Figura 20. Comparativa de los valores obtenidos mediante ELISA e inmunodifusión radial (IR). La línea negra representa el ajuste por mínimos cuadrados de los valores representados. La línea roja discontinua representa $y=x$.

4.2.3 Desarrollo y validación de un ELISA para la determinación de Hp canina

De la misma manera que se ha descrito para la ITIH4 de perro, se ha desarrollado un ELISA tipo sándwich para la determinación de Hp en muestras de suero de perro, utilizando anticuerpos anti Hp de perro inmunopurificados.

La purificación de los anticuerpos específicos frente a la Hp canina se llevó a cabo haciendo pasar el antisuero específico por una columna de afinidad a la que se había fijado la Hp de perro previamente purificada (apartados 3.6.2.2 y 3.6.3.1).

Durante el desarrollo del ELISA se optimizaron tanto las concentraciones de anticuerpo de captura como de anticuerpo de revelado (anticuerpo marcado con peroxidasa), así como los tiempos de incubación, composición de los tampones de reacción, agentes bloqueantes de los pocillos, etc. Una vez puestas a punto las condiciones analíticas, se realizó una validación del método mediante la

Resultados

determinación de los límites de detección (LoD) y cuantificación (LoQ), precisión, linealidad y comparativa con la inmunodifusión radial, de la misma manera que se ha descrito para el ELISA de la ITIH4 canina.

El LoD del ELISA fue de 0,9 ng/mL y el LoQ de 3,3 ng/mL. De acuerdo con el LoQ y el límite superior de linealidad de la curva de calibrado se ha establecido un rango analítico para el ensayo de 4-132 ng/mL de Hp. Las muestras de suero de perro han de diluirse 1:50000 para analizarse mediante este método. Esto permite cuantificar muestras de suero de perro en un rango de Hp comprendido entre 0,20 – 6,58 mg/mL. Este rango de concentraciones engloba los niveles de Hp en suero descritos para animales sanos, que irían desde niveles no detectables hasta 3 mg/mL (Eckersall et al., 1999; Ceron et al., 2005) .

El ELISA desarrollado mostró una baja imprecisión al evaluarse esta mediante la determinación de los CV para tres muestras de suero de perro con alta, media y baja concentración de Hp. Tal y como se muestra en la tabla 9, los CV fueron menores del 5 % en la evaluación de la repetitividad (CV intra-ensayo, n=10) y estuvieron comprendidos entre el 7% y el 10,6% al evaluar la reproducibilidad de las medidas en 10 ensayos independientes (CV inter-ensayo).

Tabla 9. Estudio de la precisión del ELISA de la Hp canina. Se efectuaron cálculos de los CV intra-ensayo (n=10) e inter-ensayo (n=10) para tres muestras de suero de perro son diferentes concentraciones de Hp (alta, media y baja).

Conc (mg/mL)	CV (%) intra-ensayo	CV (%) inter-ensayo
5,0	1,7	7,0
1,5	3,9	6,6
0,4	4,7	10,6

Resultados

A partir de una muestra de suero de perro de concentración conocida (5,0 mg/mL de Hp) se ha evaluado la linealidad del ensayo. Para ello se prepararon diluciones de concentración decreciente de Hp, que se analizaron mediante ELISA. En la figura 14 se muestra la representación de los valores obtenidos en el ensayo para cada una de las diluciones preparadas, comparando con los valores teóricos calculados a partir de la concentración de la muestra sin diluir y del factor de dilución. Como puede verse en la **figura 21**, los valores obtenidos para cada una de las diluciones se ajustan a los valores teóricos esperados, sin que se observe desviación de la linealidad en el rango analítico.

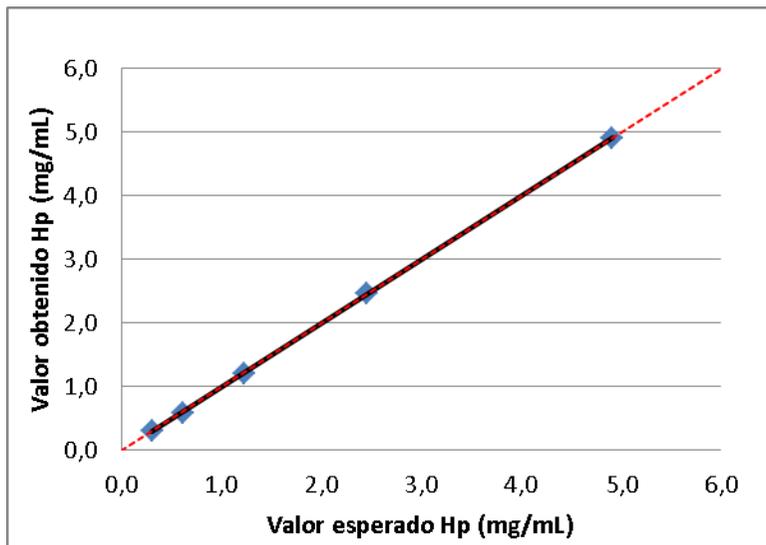


Figura 21. Estudio de la linealidad en ELISA de Hp mediante dilución de un suero de perro de concentración conocida. La línea negra corresponde al ajuste por mínimos cuadrados de los valores obtenidos, representados frente a los valores teóricos esperados. La línea roja representa $y=x$.

En la figura 22, se muestra la comparación de los valores obtenidos para las muestras de suero de perro analizadas por ELISA y por IR. Se analizaron 40 muestras de sueros por duplicado, por ambos métodos. El análisis mediante regresión lineal mostró una elevada correlación entre ambos métodos. El

coeficiente de correlación (R) fue superior a 0,99, siendo la ecuación que relaciona ambos métodos la siguiente:

$$Hp_{ELISA} \text{ (mg/mL)} = 0,9896 \times Hp_{IR} \text{ (mg/mL)} + 0,0369$$

El intervalo de confianza de la pendiente, calculado al 95%, estuvo comprendido entre 0,963 y 1,011 y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen entre -0,062 y 0,136 mg/mL. Por tanto la pendiente no difiere de uno, y la ordenada en el origen no difiere de cero, por lo que existe equivalencia analítica entre ambos métodos.

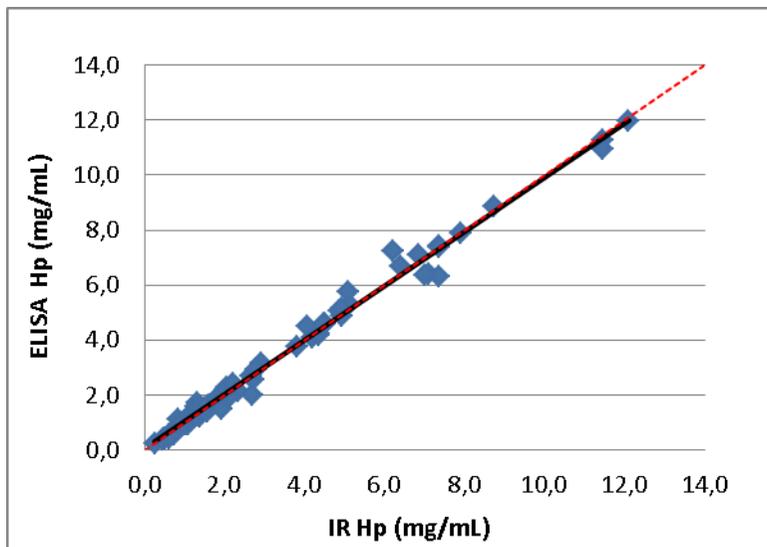


Figura 22. Comparativa de los valores obtenidos mediante ELISA e IR para Hp de perro. La línea negra representa el ajuste por mínimos cuadrados de los valores representados. La línea roja discontinua representa $y=x$.

4.2.4 Método turbidimétrico para la cuantificación de CRP canina. Adaptación para su uso en placa microtiter.

Los antisueros anti CRP canina obtenidos tal y como se han descrito en esta tesis, fueron utilizados para el desarrollo de un método inmunturbidimétrico para

Resultados

la determinación de CRP canina (Piñeiro et al., 2018). Este trabajo se engloba dentro del proyecto IPT-010000-2010-001.

La validación del método turbidimétrico fue realizada en el Servei de Bioquímica Clínica Veterinaria, de la Universidad Autónoma de Barcelona utilizando un analizador Olympus AU400 y se describe en Piñeiro et al., 2018. A modo informativo se describen a continuación en la figura 23 los principales parámetros evaluados y los resultados obtenidos.

TIPO DE MÉTODO	Inmunoturbidimetría amplificada con partículas de látex			
MEDIDA (λ)	600 nm			
RANGO DINÁMICO	0-150 mg/L			
PROZONA	>320 mg/L			
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	1,4 mg/L			
ESTUDIOS DE INTERFERENCIAS	Ausencia de interferencias con bilirrubina ($\leq 0,150$ g/L), hemoglobina (≤ 20 g/L) y triglicéridos (≤ 10 g/L)			
PRECISIÓN	CV (%) Intra-serial	CV (%) Inter-serial	CV (%) Inter-diaria	CV (%) Total
S1 (135 mg/L)	1,22	0	1,07	1,52
S2 (36 mg/L)	1,60	1,02	2,84	3,42
S3 (11 mg/L)	1,19	0,94	4,09	4,37

Figura 23. Características analíticas del método inmunoturbidimétrico para la cuantificación de CRP canina. Datos procedentes de Piñeiro et al., 2018.

Debido a la necesidad del uso de un analizador automático para la medida de CRP por este método y a que no es común que los laboratorios que no sean clínicos posean este tipo de aparatos, el ensayo inmunoturbidimétrico se adecuó y se validó para realizarse en microplacas y medirse con ayuda de un lector de

Resultados

placas microtiter. Además mediante esta adaptación de la metodología fue posible cuantificar la CRP en aquellas muestras de las que no se disponía de un volumen suficiente para realizar la cuantificación mediante un analizador automático.

El volumen de los reactivos utilizados para el análisis de las muestras en microplaca fue el mismo que se describe para la cuantificación de CRP canina en analizador automático (Tabla 10). Sin embargo para adaptar el procedimiento a la lectura en placa microtiter se realizó una lectura a punto final, utilizando un único reactivo obtenido mediante la mezcla de las cantidades correspondientes de R1 (buffer) y R2 (reactivo látex), al que se restó un blanco de reactivo. Las muestras (3 μ L) se aplicaron directamente en la placa microtiter, se añadió el reactivo, se mezcló y se incubó durante 10 minutos, tras los cuales se realizó una medida a 595 nm. Para la optimización del tiempo de lectura se tuvo en cuenta la cinética de la reacción. Se utilizó un tiempo en el que la reacción alcanza el equilibrio, de modo que las diferencias de tiempo de reacción entre las primeras y últimas muestras aplicadas a la placa microtiter fuera irrelevante.

Tabla 10. Comparativa de las condiciones para el análisis de CRP canina del nuevo ensayo inmunoturbidimétrico en un analizador Olympus AU 400 y adaptado a microplaca. (* temperatura ambiente)

	Analizador Olympus AU400	Adaptado a microplaca
Vol. de muestra (μ L)	3	3
Vol. de tampón de reacción, R1 (μ L)	230	230
Vol. de inmunopartículas de latex, R2 (μ L)	70	70
Longitud de onda (nm)	600	595
Temperatura de la reacción ($^{\circ}$ C)	37	20-25*
Primera lectura (s)	216	600
Segunda lectura (s)	450	---
Tiempo en que se añaden las inmunopartículas (s)	180	Mezcla R1+R2 desde inicio
Método de calibración	Poligonal	Polinomio orden 2

El método se validó realizando un estudio del límite de cuantificación, la precisión, linealidad, y comparativa con el método validado para Olympus AU400.

EL LoQ del método adaptado a placa microtiter, se ha determinado mediante el cálculo del error total, a partir del error obtenido (bias) al medir una muestra de concentración baja y su coeficiente de variación (4 repeticiones en 4 ensayos), mediante la fórmula: %Te = %bias + 2CV. Como criterio se ha seleccionado aquella concentración cuyo Te no supere el 30 %.

El LoQ del ensayo fue de 3,3 mg/L de CRP.

La precisión se evaluó mediante el cálculo del CV intra e inter ensayo, para dos muestras de suero de diferente concentración. Tal y como se muestra en la tabla 11, el CV fue inferior al 6%

Tabla 11. Estudio de la precisión para la determinación de CRP mediante inmunoturbidimetría en placa microtiter. Se efectuaron cálculos de los CV intra-ensayo (n=15) e inter-ensayo (n=15) para dos muestras de suero de perro son diferentes concentraciones de CRP (alta y baja).

Conc (mg/mL)	CV (%) intra-ensayo	CV (%) inter-ensayo
21	5,6	5,4
90	3,5	4,6

La linealidad se ha evaluado a partir de diluciones, de una muestra de suero de perro de concentración conocida (113 mg/L). En la [figura 24](#) se muestra la representación de los valores obtenidos en el ensayo para cada una de las diluciones preparadas, comparando con los valores teóricos calculados a partir de la concentración de la muestra sin diluir y del factor de dilución. Como puede verse, los valores obtenidos para cada una de las diluciones se ajustan a los valores teóricos esperados, sin que se observe desviación de la linealidad en el rango analítico.

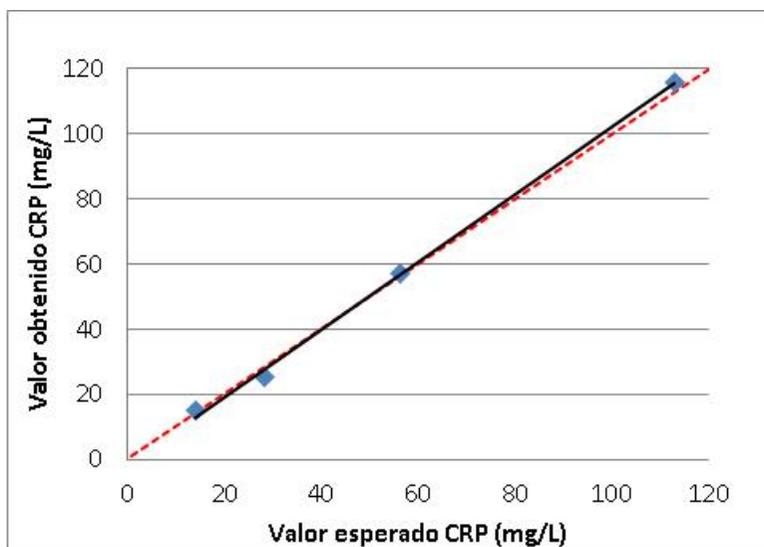


Figura 24. Estudio de la linealidad mediante dilución de un suero de perro de concentración conocida. La línea negra corresponde al ajuste por mínimos cuadrados de los valores obtenidos en el ensayo, representados frente a los valores esperados (valor calculado a partir del valor de la muestra sin diluir y el factor de dilución). La línea roja representa $y=x$.

En la figura 25, se muestra la comparación de los valores obtenidos para las muestras de suero de perro analizadas mediante el método inmunoturbidimético en placa y con un analizador automático Olympus AU400. Se analizaron 26 muestras de sueros por duplicado, por ambos métodos. El análisis mediante regresión lineal mostró una elevada correlación entre ambos métodos. El coeficiente de correlación (R) fue superior a 0,98, siendo la ecuación que relaciona ambos métodos la siguiente:

$$\text{CRP}_{\text{placa}} \text{ (mg/L)} = 0,956 \times \text{CRP}_{\text{Olympus}} \text{ (mg/L)} + 3,499$$

El intervalo de confianza de la pendiente, calculado al 95%, estuvo comprendido entre 0,882 y 1,025 y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen entre -0,049 y 7,048 mg/L. Por tanto la pendiente no difiere de uno, y la

ordenada en el origen no difiere de cero, por lo que existe equivalencia analítica entre ambos métodos.

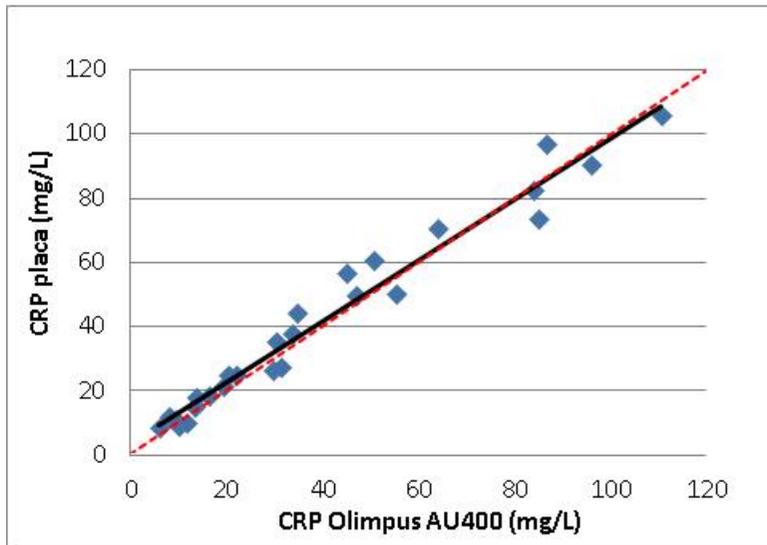


Figura 25. Comparativa de los valores obtenidos mediante el método inmunoturbidimétrico para CRP canina adaptado a placa y con el analizador Olympus AU400 para CRP de perro. La línea negra representa el ajuste por mínimos cuadrados de los valores representados. La línea roja discontinua representa $y=x$.

4.3 Caracterización de ITIH4 como PFA en el perro. Modelos experimentales

4.3.1 Estudio en muestras de perros sometidos a cirugía mayor.

Para determinar si la ITIH4 se comporta como PFA en el perro, se han medido los niveles de esta proteína, junto con el resto de PFAs para las que se han desarrollado inmunoensayos en esta tesis (CRP, Hp y GPA), en muestras de suero de animales sometidos a cirugía mayor. La medida de dichas proteínas se realizó mediante IR. En el estudio se evaluaron 10 hembras sujetas a mastectomía (grupo Mast, figura 26), y 9 a ovariectomías (grupo OVH,

Resultados

figura 26). Se obtuvieron muestras de sangre inmediatamente antes de la cirugía (control) y transcurridas 24 horas de la misma.

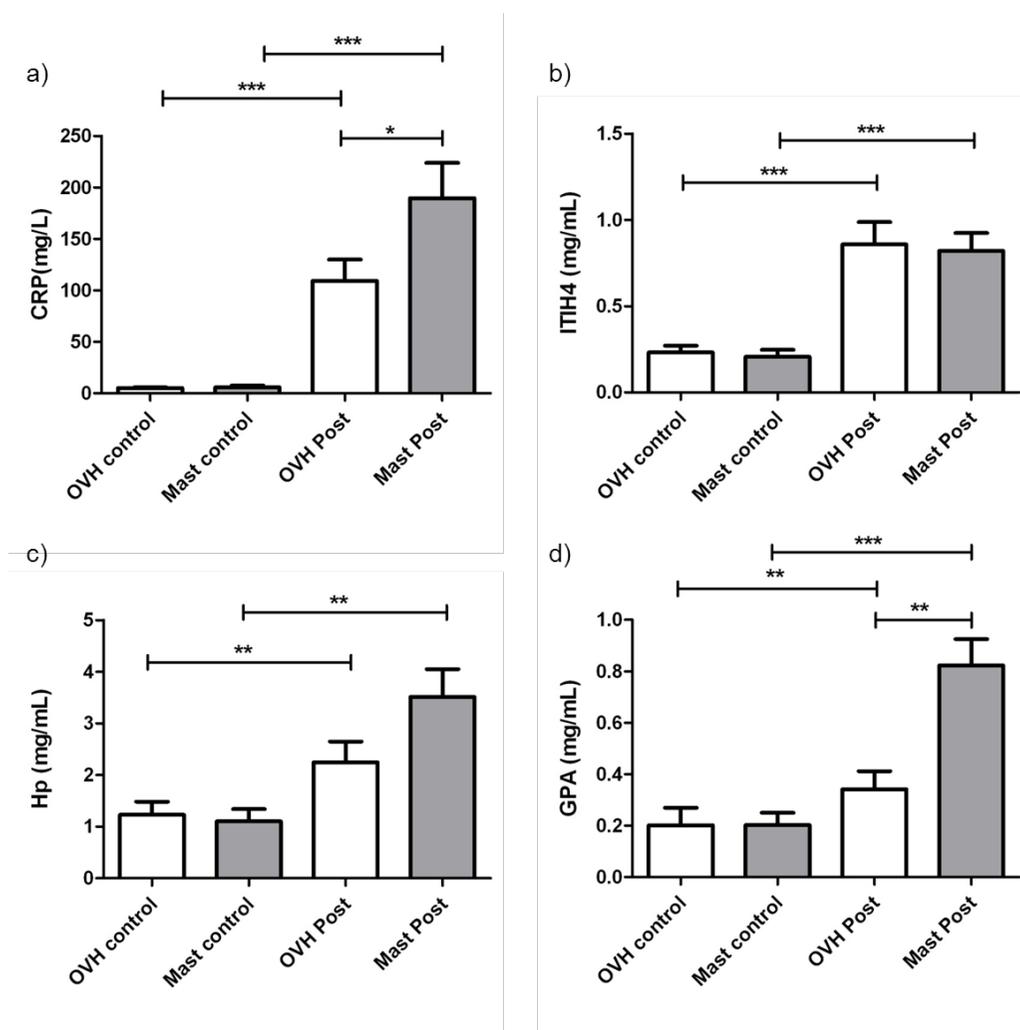


Figura 26. Evolución de las PFA's caninas en perras tras cirugía mayor. Los datos están expresados como media \pm SD. a) CRP, en mg/L; b) ITIH4, en mg/mL; c) Hp, en mg/mL y d) GPA, en mg/mL. Las muestras Control están tomadas antes de la cirugía y las muestras Post, 24 h después de la cirugía. Ovariohisterectomía (OVH, n = 9) y Mastectomía (Mast, n = 10). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Los valores de CRP en las muestras de sueros de los animales sometidos a cirugía mostraron un aumento significativo respecto del valor que presentaban

Resultados

estos mismos animales antes de la cirugía (Figura 26.a). Este aumento medio es más elevado en el grupo de perras a las que se practicó una mastectomía en comparación con el grupo OVH. La concentración de CRP en los animales sujetos a mastectomía experimentó un incremento superior a 32 veces el valor pre-cirugía, alcanzando un valor promedio de 190 ± 102 mg/L de CRP (media \pm SD). Los animales sujetos a OVH mostraron un incremento superior a 20 veces el valor inicial (control pre-cirugía). Los dos grupos control presentaron valores de CRP por debajo de 10 mg/L.

Las muestras de suero de perro obtenidas 24 horas después de ambas cirugías (OVH y Mast), presentaron aumentos significativos en el valor de ITIH4 respecto del control, (Figura 26.b). En ambos casos el incremento fue superior a 3,5 veces, concretamente 3,7 veces para OVH y 4 veces para Mast, no observándose diferencias significativas entre las dos cirugías. La concentración de ITIH4 en los sueros de perro post cirugía alcanzó valores promedio de $0,86 \pm 0,39$ mg/mL tras OVH, y $0,82 \pm 0,32$ mg/mL tras mastectomía. Antes de la cirugía el grupo de animales que iba a ser sometido a OVH mostró un valor promedio de $0,23 \pm 0,12$ mg/mL de ITIH4, similar al del grupo de animales sujetos a mastectomía ($0,21 \pm 0,13$ mg/mL de ITIH4).

Los niveles medios de Hp también aumentaron tras ambas cirugías (Figura 26,c). El grupo sujeto a mastectomía mostró un incremento medio de aproximadamente 3 veces el valor inicial alcanzándose valores de $3,51 \pm 1,71$ mg/mL de Hp (media \pm SD) 24 horas después de la mastectomía, frente a un valor inicial de $1,10 \pm 0,75$ mg/mL de Hp. Los animales sujetos a OVH mostraron un incremento medio de 1,8 veces el valor inicial de Hp, aumentando desde un valor promedio de $1,23 \pm 0,72$ mg/mL hasta $2,25 \pm 1,14$ mg/mL.

Los sueros de los animales presentaron diferencias significativas en los valores de α_1 -glicoproteína ácida (GPA) antes y 24 horas tras ambas cirugías. Los animales sometidos a OVH, experimentaron un aumento desde $0,20 \pm 0,19$ mg/mL hasta $0,34 \pm 0,20$ mg/mL de GPA, respectivamente. 24 horas tras la mastectomía el valor de GPA (media \pm SD) se vio aumentado de $0,20 \pm 0,15$

mg/mL a $0,82 \pm 0,32$ mg/mL de GPA, mostrando un incremento significativo de 4 veces respecto del control y superior al experimentado por los animales sometidos a OVH.

Tabla 12. Correlación entre las concentraciones de las diferentes PFA determinadas en el estudio. Se muestran los valores del coeficiente de correlación Rho de Spearman entre las PFAs estudiadas (ITIH4, CRP, Hp y GPA) en el total de la población de animales del estudio (n=19).

	CRP		Hp		GPA	
	Rho	p	Rho	p	Rho	p
ITIH4	0,77	<0,001	0,58	<0,001	0,57	<0,001
CRP			0,52	0,0016	0,57	<0,001
Hp					0,62	<0,001

p significación de la correlación de Spearman

El cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman, mostró una correlación significativa entre ITIH4 y el resto de las PFAs (CRP, Hp y GPA; Tabla 8), siendo la correlación entre CRP e ITIH4 la más elevada (Rho= 0,77). Las correlaciones entre ITIH4 y Hp o GPA (Rho=0,58 y Rho=0,57 respectivamente), fueron equivalentes a la mostrada entre CRP y Hp (Rho=0,52) o Hp y GPA (Rho=0,57).

4.3.2 Caracterización de los niveles de ITIH4 en el suero de perras afectadas por piometra.

Para la determinación de ITIH4 como en piometra, se estudió esta proteína en muestras de suero procedentes de 11 perras afectadas por piometra cerrada

Resultados

(Grupo piometra) y se compararon sus valores con los encontrados en 14 perras sanas (Grupo control). La respuesta de ITIH4 se comparó con la respuesta de CRP y Hp.

Los animales afectados por piometra presentaron una elevación significativa en los niveles de: temperatura corporal, recuento total de glóbulos blancos, hemoglobina, hematocrito, alanina aminotransferasa y nitrógeno uréico en sangre, respecto al grupo control (Tabla 7).

Tabla 13. Parámetros clínicos en grupo control y en el grupo piometra.

	Control		Piometra		p valor
	media ± SD	rango	media ± SD	rango	
TC (°C)	37,6 ± 0,3	37,1-38,2	38,6 ± 0,6	37,5-39,4	0,0010
WBC (x10⁹/L)	10,7 ± 1,9	7,7-14,2	28,7 ± 6,3	21,9-39,2	<0,0001
Neutrófilos (%)	1,1 ± 0,7	0-2	4,5 ± 1,5	4-6	<0,0001
HGB (g/dL)	15,9 ± 1,5	13,8-18,7	21,3 ± 2,0	18,9-25,4	<0,0001
Ht (%)	43,2 ± 2,1	39,2-48,1	56,7 ± 1,5	54,1-58,5	<0,0001
ALT (U/L)	35,6 ± 5,6	25-45	57,0 ± 7,4	50-72	<0,0001
Bilirrubina (mg/dL)	0,14 ± 0,04	0,1-0,2	1,54 ± 0,92	0,7-3,1	<0,0001
Creatinina (mg/dL)	0,9 ± 0,2	0,54-1,2	2,0 ± 0,4	1,7-3,1	<0,0001
BUN (mg/dL)	29,6 ± 6,5	21-42	62,5 ± 19,7	44-102	<0,0001

TC: temperatura corporal, WBC: recuento total de glóbulos blancos, HGB: hemoglobina, Ht: hematocrito, ALT: Alanina aminotransferasa, BUN: Nitrógeno ureico en sangre (del inglés, Blood urea nitrogen)

Resultados

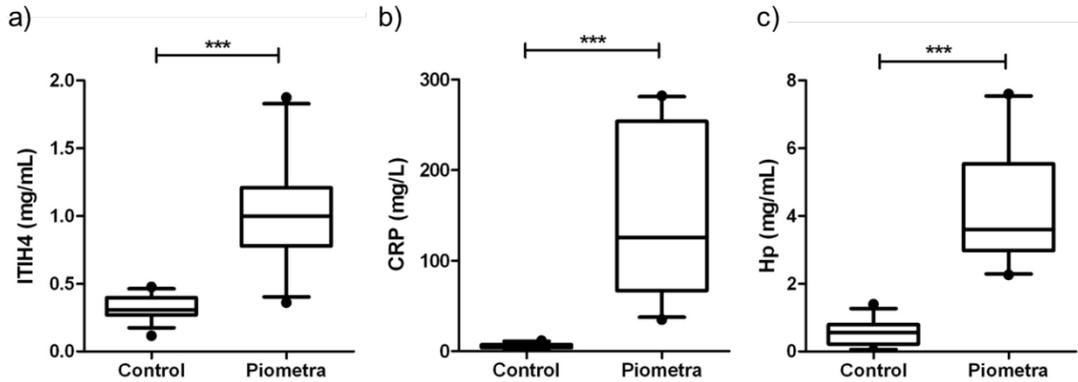


Figura 27. Comparativa de los niveles de las PFA caninas en perros sanos y perros afectados por piometra. Concentración de a) ITIH4, b) CRP y c) Hp, determinada en los sueros de los animales sanos (grupo control) y de los animales afectados por piometra. Las cajas representan el percentil 25-75 de las muestras, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana y los bigotes representan el percentil 10 a 90. Los asteriscos representan el nivel de significación entre los grupos, *** $p < 0,001$.

En la Figura 27, se observa que los valores, tanto de ITIH4 como de CRP y de Hp, son más elevados en el grupo de animales afectados por piometra que en el grupo control, siendo las diferencias entre ambos grupos significativas para cada una de las PFA determinadas.

La concentración de ITIH4 en los animales afectados por piometra mostraron un incremento de 3,2 veces el valor obtenido para los animales sanos, alcanzando una concentración promedio de ITIH4 de $1,02 \pm 0,41$ mg/mL (media \pm SD). Los valores de ITIH4 para cada uno de los animales pertenecientes al grupo control variaron desde 0,12 mg/mL a 0,47 mg/mL. En el grupo con piometra los valores estuvieron comprendidos entre 0,36 mg/mL y 1,88 mg/mL. Solo un animal afectado por piometra mostró un valor de ITIH4 inferior al máximo valor encontrado en el grupo control (0,36 mg/mL de ITIH4).

El valor medio de CRP en el grupo de animales afectados por piometra fue de $147,5 \pm 91,3$ mg/L (media \pm SD), 26 veces superior al que se encontró en los animales clínicamente sanos. La concentración de CRP para estos animales

Resultados

sanos se encuentran en un rango de valores comprendido entre 2,7 y 10 mg/L, mientras que en el grupo piometra estos valores están comprendidos entre 35,0 - 281,8 mg/L.

La concentración de Hp en el grupo piometra fue 7 veces superior al valor encontrado para los animales sanos, alcanzando un valor medio de $4,2 \pm 1,8$ mg/mL. Los valores de Hp obtenidos para el grupo control mostraron un valor medio de $0,57 \pm 0,41$ mg/mL (media \pm SD) para esta proteína. Los valores de Hp obtenidos para los animales de cada grupo no se solaparon, siendo el rango de valores para el grupo control desde 0,043 mg/mL hasta 1,4 mg/mL de Hp, y para el grupo piometra desde 2,3 hasta 7,6 mg/mL de Hp.

Tabla 14. Cálculo del valor del coeficiente de correlación Rho de Spearman, entre las PFA estudiadas (ITIH4, CRP, y Hp) en el total de la población de animales del estudio (n=25).

Variables comparadas	Rho	p
ITIH4 vs CRP	0,8182	<0,0001
ITIH4 vs Hp	0,7870	<0,0001
CRP vs Hp	0,8071	<0,0001

p significación de correlación de Spearman

En la tabla 14 se muestran los resultados del estudio de la correlación entre las diferentes PFA analizadas. El grado de correlación obtenido a partir del cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman, fue elevado para todas las comparativas estudiadas. La correlación entre ITIH4 y CRP (Rho=0,82) fue equivalente a la encontrada por ITIH4 y Hp (Rho=0,79), así como la que presentaron CRP y Hp (Rho=0,81).

4.3.3 Proteínas de fase aguda tras infección experimental con *L. infantum*

4.3.3.1 Estudio 1. Evaluación de los niveles de PFAs en animales con leishmaniosis

Se han determinado, mediante IR, los valores de PFAs en muestras de 5 Beagles infectados con *L. infantum* y que presentaban sintomatología clínica asociada con la enfermedad. Los valores de estas proteínas se compararon con los obtenidos para tres animales que constituían el grupo control negativo de la infección. Las muestras, tanto de suero sanguíneo como la biopsia hepática, se obtuvieron un año después de la infección con *L. infantum*.

Cuantificación de los valores PFAs en muestras de suero.

En la figura 28 se comparan los valores medios obtenidos para cada una de las PFA analizadas (ITIH4, CRP, Hp y GPA) en el grupo infectado y el grupo control. Todos los animales en del grupo infectado resultaron positivos para Leishmania en los análisis por PCR y serología, mientras que el grupo control resultó negativo.

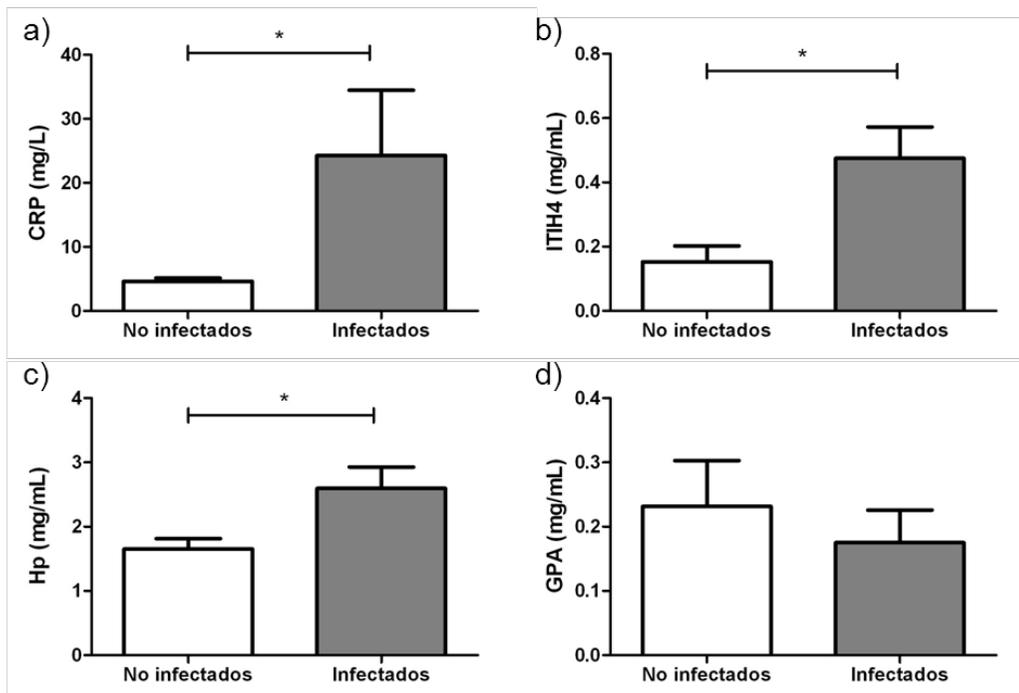


Figura 28. Representación de los valores de las PFAs en muestras de suero, para el grupo de animales no infectado y para el grupo de animales infectado. Los datos se muestran como media + SD. a) CRP, b) ITIH4, c) Hp y d) GPA. Los asteriscos representan el nivel de significación entre grupos, * $p < 0,05$.

El grupo de animales infectados presentó aumentos moderados en los valores de CRP, ITIH4 y Hp, mientras que los valores de GPA, por el contrario, mostraron un descenso no significativo entre ambos grupos. Los valores promedio de CRP, ITIH4 y Hp en el grupo control fueron bajos, y dentro del rango de normalidad según se describe más adelante en el apartado 3.8.5 ($4,9 \pm 1,4$ mg/L para CRP, $0,16 \pm 0,10$ mg/mL para ITIH4 y $1,75$ mg/mL para Hp; media \pm SD).

En la tabla 15 se muestran los valores de CRP, ITIH4 y Hp, así como la puntuación clínica asignada para cada uno de los animales del grupo infectado por *L. infantum*. Los animales asintomáticos presentaron valores bajos de CRP e ITIH4 y los animales sintomáticos presentaron valores más altos de ambas proteínas. Los animales sintomáticos, presentaron valores de CRP superiores a 12 mg/L. Para la ITIH4, los animales asintomáticos mostraron valores por debajo de $0,36$ mg/mL mientras que los que presentaron sintomatología tenían valores de ITIH4 por encima de $0,4$ mg/mL. Los valores de Hp y GPA obtenidos para cada animal fueron independientes de la sintomatología presentada por el mismo. Los animales asintomáticos no presentaron los valores más bajos de Hp y GPA, en comparación con los sintomáticos.

Resultados

Tabla 15. Puntuación clínica (PC) asignada para cada animal infectado, clasificación según criterios sintomatológicos y valores de CRP (mg/L), ITIH4 (mg/mL), Hp (mg/mL) y GPA (mg/mL) cuantificados.

PC	Clasificación sintomatológica		CRP	ITI4	Hp	GPA
1	Asintomático	Subclínica	11,3	0,246	1,76	0,173
1	Asintomático	Subclínica	12,1	0,353	2,52	0,075
2	Oligosintomático	Clínica	29,4	0,429	2,82	0,070
3	Polisintomático	Clínica	61,7	0,815	3,73	0,347
5	Polisintomático	Clínica	16,9	0,533	2,15	0,210

Cuantificación de la expresión génica de CRP e ITIH4 en muestras hepáticas.

El diseño de los cebadores de CRP e ITIH4, ha permitido, de manera satisfactoria, la cuantificación de la expresión génica de ambas proteínas en muestras de hígado mediante qPCR. De esta manera se ha podido cuantificar el nivel de expresión de cada uno de los mRNA en los dos grupos de animales (Figura 29).

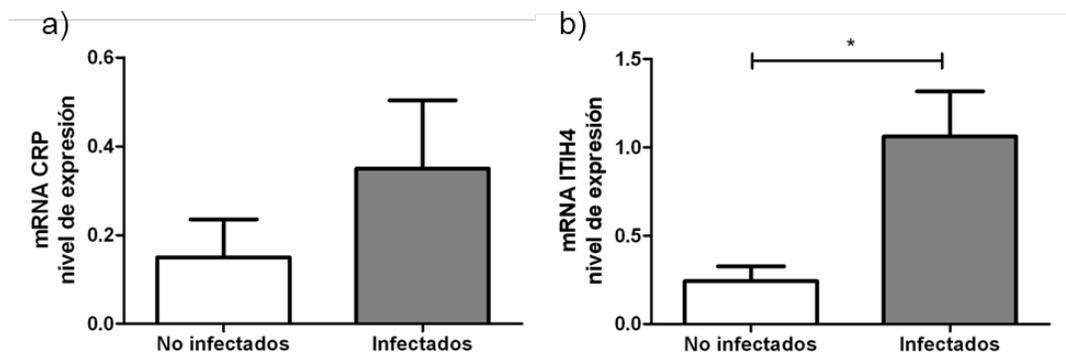


Figura 29. Representación comparativa de los niveles de expresión de mRNA en muestras hepáticas. Se representa el valor medio obtenido de CRP e ITIH4 para el grupo de animales no infectados y el grupo de animales infectados. * $p < 0,05$.

El nivel de expresión génica de CRP no mostró un aumento significativo en los animales infectados por *Leishmania* en comparación con los animales control. Sin embargo, la expresión génica de ITIH4 sí que se vio aumentada de forma significativa en el grupo de animales infectados frente al grupo control.

4.3.3.2 Estudio 2. Evolución de las PFAs a lo largo de la infección

En un segundo estudio se ha monitorizado la evolución de las PFA en 10 animales (5 machos y 5 hembras) durante un periodo de 10 meses tras la infección experimental con *Leishmania infantum*. Se obtuvieron muestras de sangre antes de la infección, transcurridas 24, 48 h, 1 semana y a los 2, 3, 4, 6, 8 y 10 meses post infección. En el momento de la toma de muestra se realizó un análisis de la situación clínica del animal, de acuerdo con procedimientos estandarizados, tal y como se describe en el apartado 3.8.4. En las muestras de suero obtenidas se determinó la concentración de CRP, ITIH4 y Hp y se realizó igualmente un análisis serológico para determinar la presencia de anticuerpos frente a *Leishmania* como se describe en el apartado 3.8.4 de materiales y métodos.

La evaluación sintomatológica general del grupo mostró la presencia de síntomas compatibles con la infección ocasionada por *Leishmania*. Los síntomas clínicos para cada animal y la puntuación total asignada en función de los mismos, se recogen en el Anexo Tabla 2. El tiempo de aparición de los síntomas clínicos fue diferente para cada animal, pero en general los animales no presentaron una sintomatología severa, no superando una puntuación de 5, en la escala del 0 al 12.

Evolución de las PFA en animales infectados con *L. infantum*

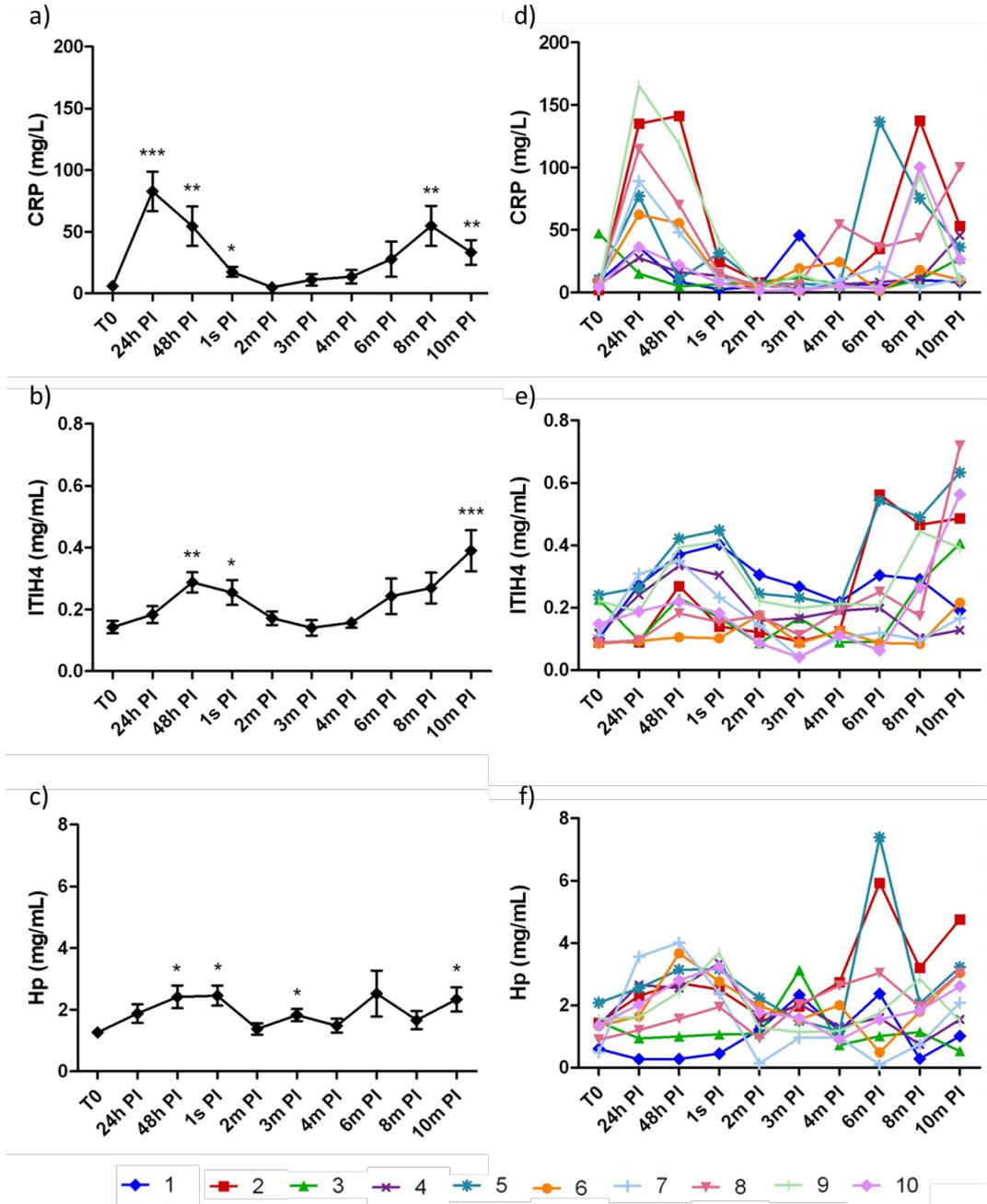


Figura 30. Evolución de la concentración de las PFA en animales infectados con *L. infantum*. Se representa la media \pm SD para: a) CRP, b) ITIH4 y c) Hp, los asteriscos representan el nivel de significación de cada uno de los tiempos frente al tiempo inicial

Resultados

pre-infección (T0) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Se representa la evolución individual de cada animal (1 a 10) para: d) CRP, e) ITIH4 y f) Hp.

En la Figura 30 a y d, se muestra la evolución de la concentración de CRP durante el periodo experimental. Tras la infección experimental, a las 24 horas se produjo un aumento elevado y significativo de la CRP, que alcanzó un valor medio de 82 ± 48 mg/L (Figura 30 a), sin embargo la magnitud del aumento no fue igual en todos los animales. Tras alcanzar un pico máximo a las 24 horas, los valores de CRP disminuyeron de forma progresiva en los siguientes puntos experimentales, para volver al estado inicial a partir de 1 semana. A partir de los dos meses, los niveles de CRP aumentaron paulatinamente, observándose un aumento significativo a partir de los 8 meses, y manteniéndose la concentración de CRP elevada hasta el final del estudio.

Los valores de ITIH4 comienzan a elevarse de manera moderada a partir de la infección (Figura 30 b). El pico máximo se alcanzó a las 48 horas (aumento medio de 2 veces el valor inicial), manteniéndose los niveles elevados transcurrida 1 semana. Pasado ese tiempo la concentración de ITIH4 descendió de manera gradual hasta alcanzar de forma general los niveles iniciales a los 2-3 meses. La concentración media de ITIH4 comenzó a elevarse de nuevo a partir del sexto mes, aunque el incremento no se hizo significativo hasta el décimo mes, cuando se alcanzó un valor medio de $0,39 \pm 0,21$ mg/mL de ITIH4, que representa un aumento de 2,7 veces el valor pre-infección.

Durante los días posteriores a la infección con *L. infantum* los valores de Hp en el suero experimentaron un aumento moderado (Figura 30 c). A las 48 horas se observa un aumento medio de 2 veces el valor pre-infección, que se mantiene transcurrida 1 semana. Este incremento es comparable con el experimentado por la ITIH4. Al igual que la ITIH4 la concentración de Hp recupera los valores iniciales a los 2 meses post-infección. A los tres meses tras la infección se observa un aumento de Hp moderado aunque significativo (1,5 veces respecto del tiempo inicial), seguido de un aumento de 1,8 veces en el tiempo final del estudio (10 meses). Este aumento a los tres meses no se ha observado anteriormente con la CRP ni con la ITIH4. De manrea individual valores individuales de CRP,

ITIH4 y Hp, obtenidos para cada animal, difieren considerablemente de unos a otros a lo largo de todo el estudio alcanzando las máximas concentraciones a diferentes tiempos, independientemente del animal y de la proteína (Fig 30 d, e, f).

Correlación de sintomatología, serología y PFAs

Tabla 16. Cálculo del valor del coeficiente de correlación Rho de Spearman, entre las PFAs estudiadas (ITIH4, CRP, Hp), las titulaciones de anticuerpos obtenidas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA y la puntuación clínica asignada (PC)

	Log IFI		ELISA		PC	
	Rho	ρ	Rho	ρ	Rho	ρ
CRP	0,52	<0,0001	0,54	<0,0001	0,45	<0,0001
ITIH4	0,56	<0,0001	0,58	<0,0001	0,41	<0,0001
Hp	0,36	0,003	0,34	0,007	0,25	0,045
PC	0,69	<0,001	0,68	<0,001		

ρ significación de correlación de Spearman

Los valores del coeficiente de correlación Rho de Spearman presentados en la tabla 16, muestran una correlación moderada entre las PFAs y las técnicas de diagnóstico serológico, expresadas como log IFI y Rz del ELISA. CRP e ITIH4 presentaron valores de correlación similares tanto para IFI, como para ELISA y para la PC. En cambio, la correlación encontrada para la Hp con cada una de las técnicas serológicas y con la puntuación clínica, fue menor.

Las correlaciones entre la puntuación clínica y las técnicas de diagnóstico serológico (IFI y ELISA) son más altas que las que se encontraron entre la puntuación clínica y las PFAs, indicando una relación general entre la sintomatología y la presencia de anticuerpos frente a *Leishmania*.

Evaluación individual de cada uno de los animales

A continuación, en las gráficas siguientes, se representan los valores de cada una de las PFAs (CRP, ITIH4 y Hp), junto con los valores de la puntuación clínica obtenida, y el resultado obtenido por las técnicas serológicas ELISA e IFI, de manera individual para cada animal involucrado en el estudio. Si de acuerdo con el análisis serológico, el animal dio resultado positivo frente a la infección por *Leishmania infantum* el color de la barra de puntuación clínica cambia de morado a naranja.

Aunque en las gráficas representadas hay animales que a lo largo del estudio se muestran negativos frente a la infección con *Leishmania* según el criterio adoptado, hay que destacar que al final del estudio, un análisis de qPCR confirmó que todos los animales eran positivos a tiempo final.

Resultados

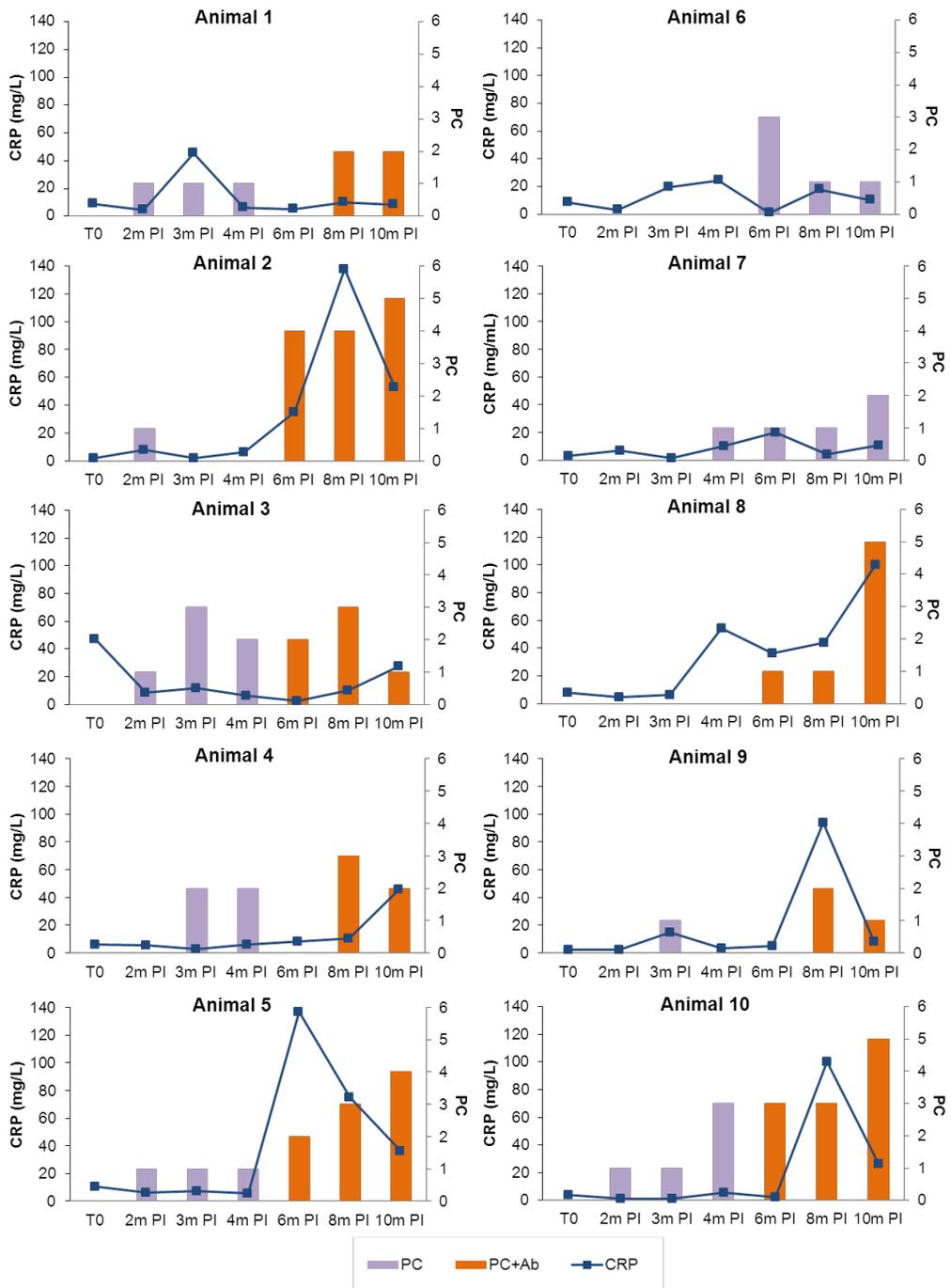


Figura 31. Representación de la evolución de los valores de CRP y la puntuación clínica de cada uno de los animales. Las barras representan el valor de puntuación clínica (PC) asignada. El color de las barras indica el resultado de los análisis serológicos frente a *Leishmania infantum*; naranja positivo, morado: negativo. Flecha naranja en el

Resultados

animal 9, representa que el animal es positivo a *Leishmania* en el análisis serológico, pero su PC es 0 por eso la ausencia de barra.

En la figura 31, puede observarse que el tiempo de aparición de los síntomas clínicos en los animales ($PC \geq 2$), así como su severidad, fue muy variable, aunque a partir de los 6 meses la mayoría de los animales fueron positivos frente a la infección con *L. infantum* (barra naranja). De acuerdo a los valores de CRP, puede verse que no todos los animales presentaron la misma evolución, es decir, no todos los animales muestran el pico máximo en los mismos tiempos, sino que dependiendo del animal el pico máximo se observa entre los 6-10 meses PI, e incluso algunos animales no presentan este aumento al final del periodo experimental. El aumento de los valores de CRP no parece anticiparse a la sintomatología clínica, pero sí se pueden asociar valores elevados de CRP a animales con un peor pronóstico: puntuación clínica alta y animales positivos frente a *Leishmania*.

Los animales 1, 6, 7, 8 y 9 mostraron valores de CRP por encima de 11 mg/L, alcanzando algunos de ellos valores de CRP hasta 60 mg/L, antes de la aparición de sintomatología clínica ($PC < 2$) y también antes de que el animal fuera positivo a *Leishmania* según el análisis serológico. Estos aumentos moderados de CRP se produjeron al principio de la infección entre los 3 y los 6 primeros meses según el animal.

Por el contrario, los animales 3 y 4, mostraron valores de CRP por debajo de 11 mg/L a lo largo de todo el estudio, independientemente de la sintomatología y de la positividad ante la infección. Solo al final del estudio, a los 10 meses tras la infección, mostraron una elevación en la concentración de CRP alcanzando valores de 28 mg/L y 45 mg/L para el animal 3 y el animal 4, respectivamente.

Los animales 2, 5, 9 y 10 son los que presentan mayores valores de CRP alcanzando picos máximos por encima de 80 mg/L. En estos animales no se ve que los valores elevados de CRP se anticipen a la sintomatología clínica o al título elevado de anticuerpos. En algunos casos el aumento de CRP se produce al

Resultados

mismo tiempo que detectan los síntomas clínicos y anticuerpos frente a Leishmania, como es el caso de los animales 5 y 9.

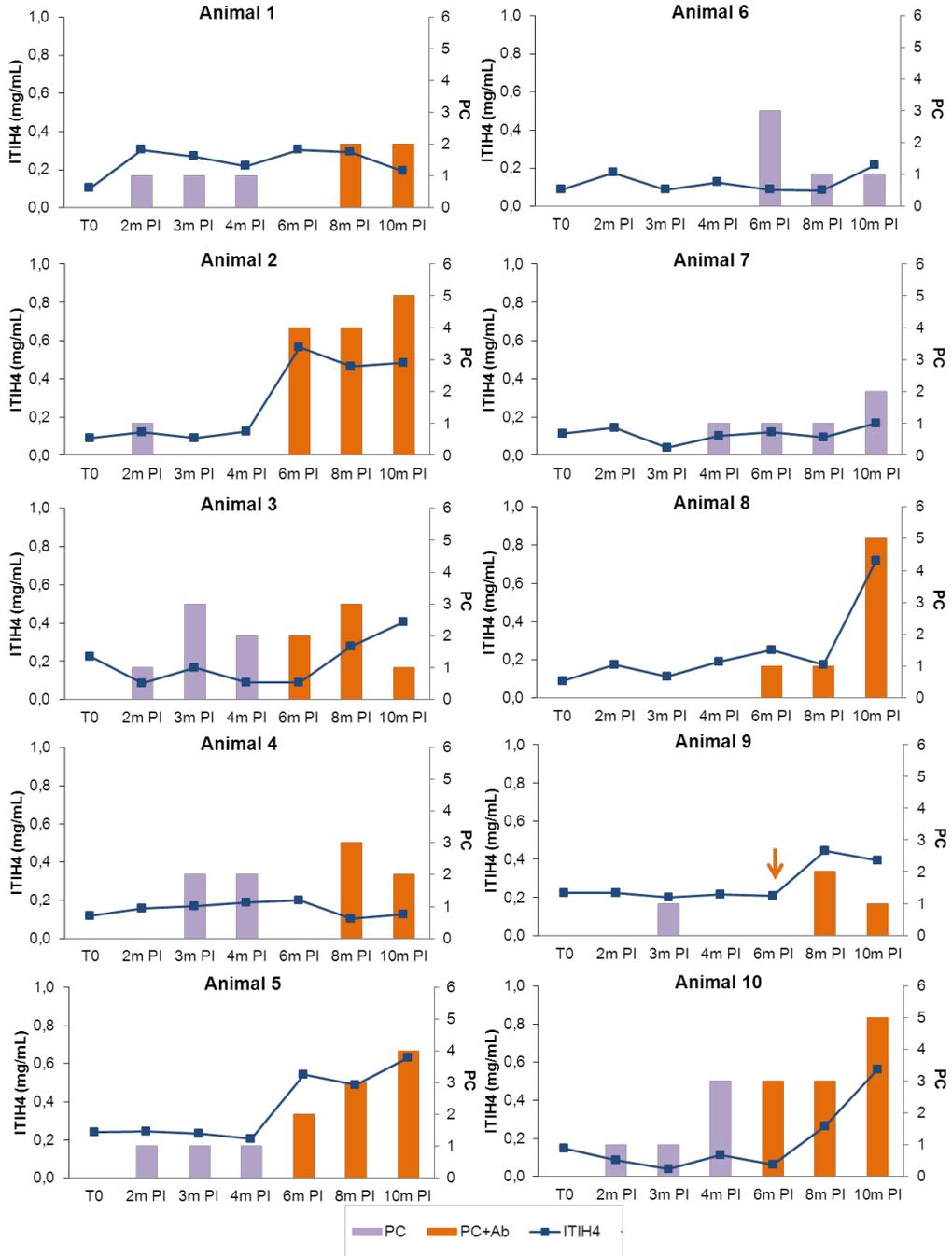


Figura 32. Representación de la evolución de los valores de ITIH4 y la puntuación clínica de cada uno de los animales. Las barras representan la puntuación clínica (PC) asignada. El color de las barras indica el resultado de los análisis serológicos frente a *Leishmania infantum*; naranja: positivo, morado: negativo. La flecha naranja en el animal 9, representa que el animal es positivo a *Leishmania* en el análisis serológico, pero su PC es 0.

En la figura 32 puede verse la evolución de la concentración de ITIH4 a lo largo del estudio, en cada uno de los animales que forman parte del grupo experimental. Al igual que sucede con la CRP no todos los animales alcanzaron valores máximos de ITIH4 en el mismo tiempo tras la infección con *L. infantum* (10 meses post-infección).

Los animales 2 y 5 son los que mayor valor de concentración de ITIH4 mostraron a los seis meses tras la infección. El máximo incremento de ITIH4 lo experimentó el animal número 2 aumentando más de 6 veces su valor pre-infección mientras que el animal 5 aumentó más de 2 veces su valor inicial. Es en el último mes, donde un 60 % de los animales (animal 2, 3, 5, 8, 9 y 10) presentaron valores de ITIH4 iguales o superiores a 0,42 mg/mL, valor máximo de normalidad establecido en beagles, llegando a alcanzar valores individuales próximos a 0,7 mg/mL de ITIH4.

Los animales 2, 5, 8 y 10 son aquellos que además de confirmarse la infección mediante serología, mostraron los valores más altos de puntuación clínica, por encima de 3, al final del estudio. La concentración de ITIH4 obtenida para el resto de los animales fue menor, independientemente de la sintomatología clínica y del resultado serológico observados.

Resultados

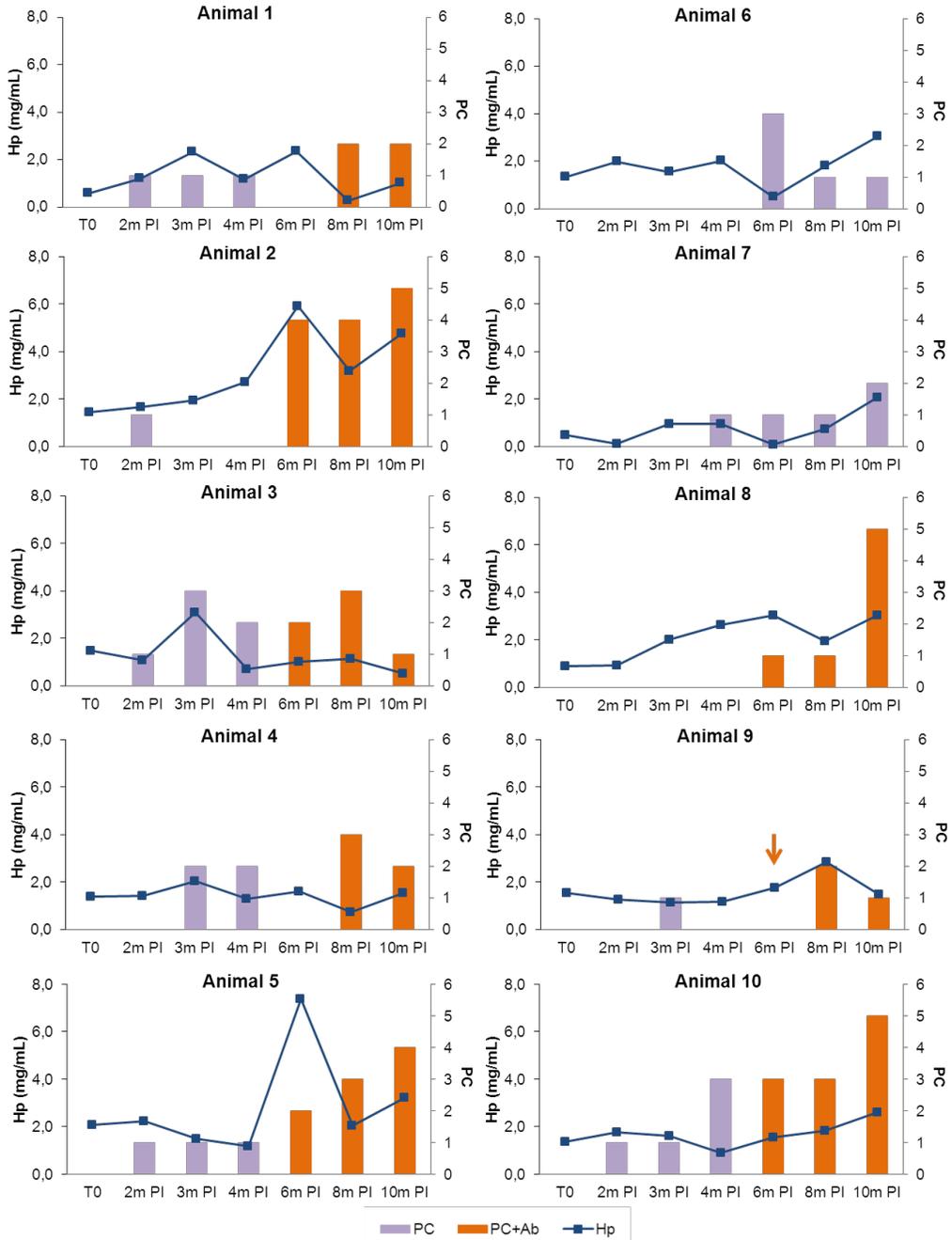


Figura 33. Representación de la evolución de los valores de Hp y la puntuación clínica de cada uno de los animales. Las barras representan la puntuación clínica (PC) asignada. El color de las barras indica el resultado de los análisis serológicos frente a Leishmania: naranja; positivo, morado; negativo. La flecha naranja en el animal 9,

representa que el animal es positivo frente a *Leishmania* en el análisis serológico, pero su PC es 0.

Como se ha mencionado anteriormente para los valores de CRP e ITIH4, la evolución de los valores de concentración de Hp es diferente para cada animal. A los 6 meses, se produjo un aumento muy elevado del nivel de Hp en el suero de dos animales (animal 2 y 5), estos valores superaron los 5 mg/mL de Hp. Estos animales coinciden con los que presentaron valores de ITIH4 por encima de 0,52 mg/mL a los 6 meses tras la infección (Figura 36).

Estableciendo el punto de corte para Hp en 2,3 mg/mL, valor por debajo del cual se considera que los animales se encuentran dentro de los valores de referencia asignados para animales sanos para esta proteína (apartado 4.4), la Hp solo se anticipa a los síntomas clínicos y a la presencia de la infección en los animales 2, 3 y 8.

El resto de animales (1, 4, 6, 7, 9 y 10) presentó valores de Hp inferiores o iguales a 2,3 mg/mL y en los tiempos en los que se superó dicho valor, fue independientemente de la puntuación clínica y de si resultado serológico indicaba resultados positivos o no.

4.4 Asignación de los valores de referencia para las PFAs en animales sanos

Para la asignación de valores de referencia para las PFA en animales sanos, se utilizaron 165 animales, de los cuales 72 pertenecían a la raza Beagle de edades comprendidas entre 6 y 12 meses, siendo 37 de ellos machos y 35 hembras. El resto de animales, 98, pertenecían a otras razas y también algunos de ellos eran mestizos, con edades comprendidas entre los 5 meses y los 10 años. De estos animales 23 eran machos, 49 eran hembras y del resto no se

Resultados

pudo asignar el sexo a la muestra del animal recibida, por lo que no se pudieron utilizar en la comparativa del sexo.

La distribución de los valores de cada una de las PFAs estudiadas (CRP, ITIH4, Hp y GPA) en función del porcentaje de animales que presentan cada uno de esos valores, se representa en la figura 34.

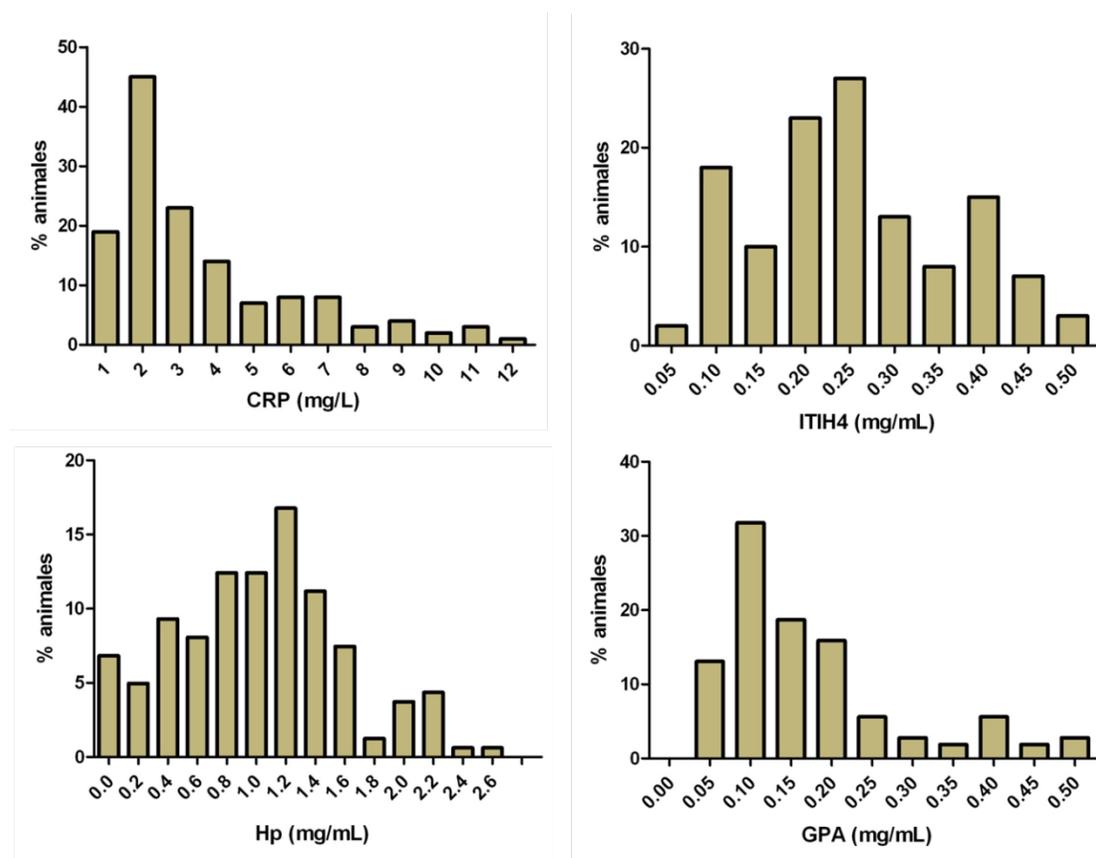


Figura 34. Distribución de los valores de PFAs en sueros de perros sanos. a) CRP, b) ITIH4, c) Hp y d) GPA

El análisis del CRP, ITIH4, Hp y GPA mediante el test Kolmogorov-Smirnov, reveló que la distribución de las muestras analizadas para la ITIH4 y la Hp siguieron una distribución normal, sin embargo para CRP y GPA se desviaba

Resultados

de la normalidad. El intervalo de referencia se determinó mediante el cálculo del percentil 2,5 – 97,5 tras la eliminación de Outliers (Tabla 17).

El cálculo del percentil 2,5 - 97,5 de los valores de CRP obtenidos para el total de la población de animales sanos evaluada, proporcionó un rango de concentraciones de 1,1 hasta 11 mg/L. Para ITIH4, el percentil incluyó un rango de 0,09 hasta 0,47 mg/mL. De los 165 animales seleccionados para la determinación de los valores de referencia 10 animales mostraron un valor de Hp por debajo del límite de detección del ELISA de Hp, por lo que estos valores fueron igualados a este valor (0,043 mg/mL de Hp), el rango obtenido para esta proteína fue desde valores por debajo de 0,04 mg/mL (LoQ) hasta 2,25 mg/mL de Hp. Para GPA el cálculo del percentil 2,5 - 97,5 mostró un rango de valores desde 0,05 mg/mL hasta 0,47 mg/mL.

Tabla 17. Valores obtenidos en el cálculo del intervalo de referencia para CRP, ITIH4, Hp y GPA, en animales clínicamente sanos.

	Media \pm SD	Percentil 2,5 -97,5
CRP (mg/L)	3,6 \pm 2,5	1,1 – 11
ITIH4 (mg/mL)	0,25 \pm 0,11	0,09 – 0,47
Hp (mg/mL)	1,02 \pm 0,58	0,04 – 2,25
GPA (mg/mL)	0,17 \pm 0,11	0,05 – 0,47

Influencia de la raza

Los valores CRP y de Hp no presentaron diferencias significativas para los perros que pertenecían a la raza Beagle y el resto de animales, entre los que se agruparon varias razas y animales cruzados. No fue así en el caso de la ITIH4 y la GPA (Figura 35). El valor de ITIH4 en el grupo de Beagles fue significativamente menor que en el grupo de animales de otras razas. Por el contrario la

Resultados

concentración media de GPA en el grupo de Beagles fue mayor que en el grupo de animales con otras razas (Tabla 18).

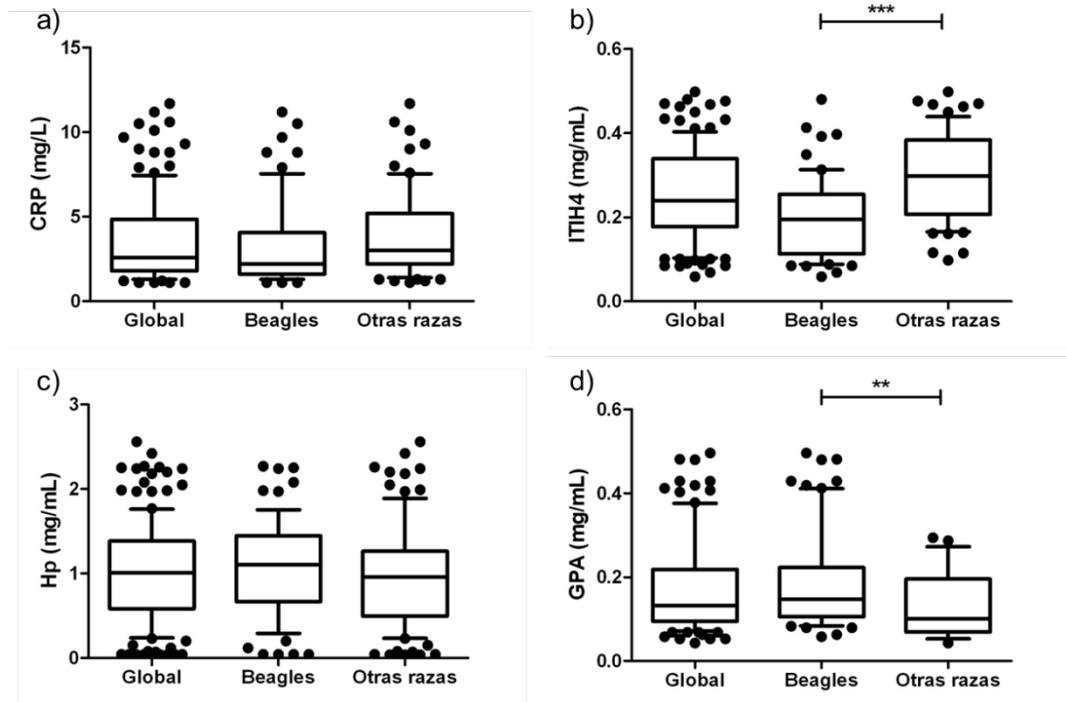


Figura 35. Comparativa de los valores de PFAs en función de la raza. a) CRP, b) ITIH4, c) Hp y d) GPA Las cajas representan el percentil 25-75 de las muestras, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana y los bigotes representan el percentil 10 a 90. Los asteriscos representan el nivel de significación entre los grupos, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla 18. Valores promedio y rangos obtenidos para ITIH4 y de GPA en Beagles y el resto de razas.

Conc (mg/mL)	Media \pm SD	Percentil 2,5 -97,5
ITIH4 Beagles	0,20 \pm 0,09	0,08 – 0,42
ITIH4 Otras razas	0,30 \pm 0,10	0,11 – 0,48
GPA Beagles	0,19 \pm 0,12	0,07 – 0,48
GPA Otras razas	0,13 \pm 0,07	0,05 – 0,30

Influencia del sexo en Beagles

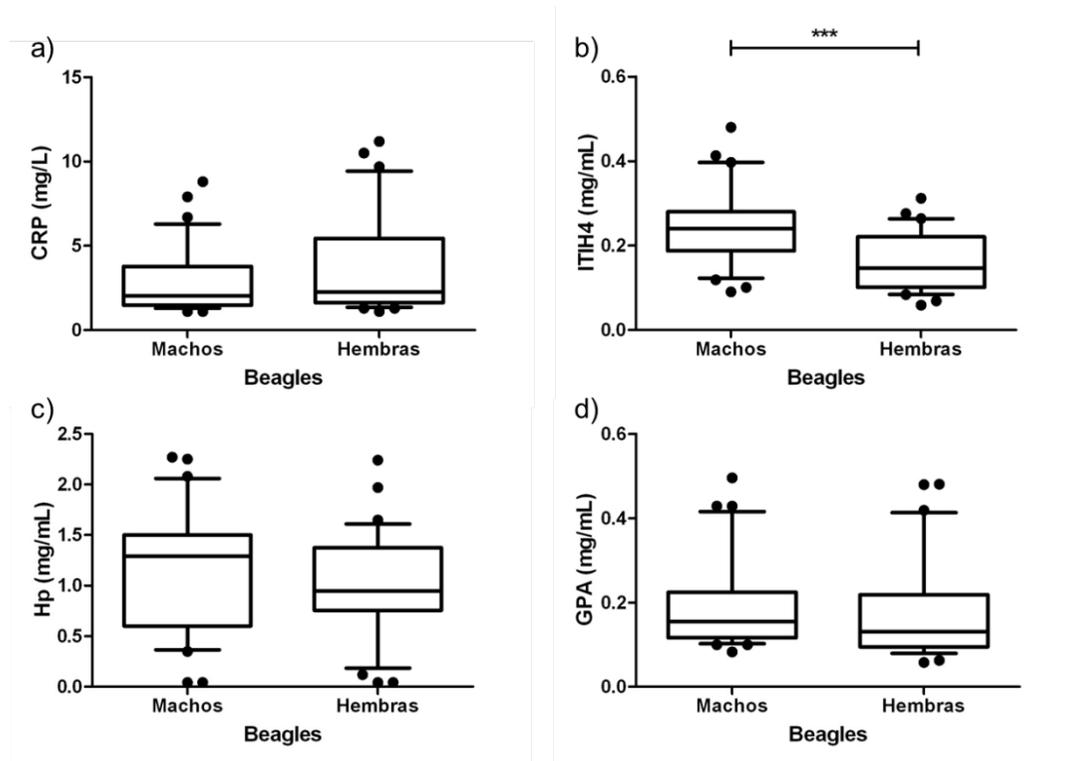


Figura 36. Comparativa de los valores de PFA entre machos y hembras en la población de Beagles. a) CRP, b) ITIH4, c) Hp y d) GPA. Las cajas representan el percentil 25-75 de las muestras, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana y los bigotes representan el percentil 10 a 90. Los asteriscos representan el nivel de significación entre los grupos, * p < 0,001.**

Tabla 19. Valores promedio y rangos obtenidos de ITIH4 en machos y hembras en la raza Beagle.

ITIH4 (mg/mL)	Media ± SD	Percentil 2,5 -97,5
Beagles Machos	0,29 ± 0,09	0,09 – 0,48
Beagles Hembras	0,16 ± 0,07	0,09 – 0,31

Resultados

La comparativa entre machos (n=37) y hembras (n=35) en la población de Beagles (Figura 36) no mostró diferencias en los valores de CRP, Hp y GPA entre ambos sexos. Los valores de ITIH4 para los machos fueron significativamente mayores que para las hembras, obteniéndose un valor (media \pm SD) de $0,25 \pm 0,09$ mg/mL de ITIH4 para los machos y de $0,16 \pm 0,07$ mg/mL para las hembras.

Influencia del sexo en el grupo de animales que engloba otras razas

El análisis de las PFA entre machos (n=23) y hembras (n=22) se ha realizado en las muestras de los animales sanos entregados en los centros de protección para que el número de machos y hembras estuviera compensado. Como puede verse en la figura 37, no se observaron diferencias significativas entre machos y hembras para ninguna de las proteínas analizadas (CRP, ITIH4, y Hp). No obstante, al igual que sucede con la población de Beagles, en el caso de la Hp el valor de la mediana fue superior para los machos que para las hembras, y en el caso de la Hp los machos presentaron mayor dispersión que las hembras.

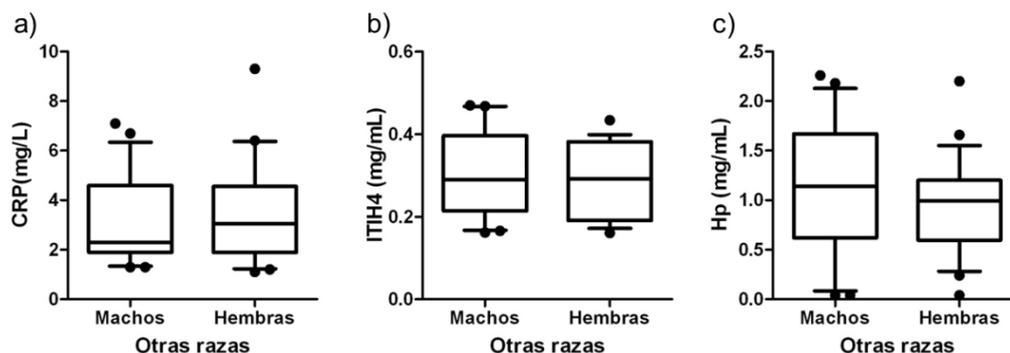


Figura 37. Comparativa de los valores de PFA entre machos y hembras en el grupo de animales que engloba varias razas. a) CRP, b) ITIH4 y c) Hp. Las cajas representan el percentil 25-75 de las muestras, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana y los bigotes representan el percentil 10 a 90.

Influencia de la edad

Los perros que pertenecían a la raza Beagle eran cachorros, con una edad comprendida entre los 6 y los 12 meses de edad. El resto de animales de los que se dispuso datos de la edad, tenían una edad comprendida entre los 5 meses y los 10 años. El estudio de la influencia de la edad en los valores de PFA se realizó con estos últimos perros. Dichos animales se clasificaron de acuerdo a su edad en tres grupos: cachorros (perros hasta 1 año, n= 16), adultos jóvenes (perros de más de un año y menos de cinco años, n=16) y adultos (perros con una edad superior o igual a los 5 años n=12).

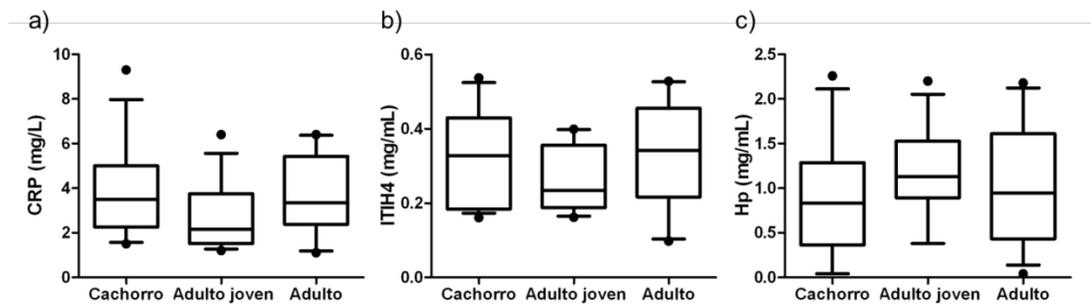


Figura 38. Valores de PFA en perros agrupados según la edad: cachorros, adultos jóvenes y adultos. a) CRP, b) ITIH4 y c) Hp. Las cajas representan el percentil 25-75 de las muestras, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana y los bigotes representan el percentil 10 a 90.

Un análisis mediante el test Kuskal-Wallis, no reveló diferencias significativas para los valores de las PFA estudiadas (CRP, ITIH4 y Hp) entre los animales agrupados en función de su edad (Figura 38). Los animales englobados dentro del grupo de adultos jóvenes presentaron una menor dispersión en los valores de CRP, ITIH4 y Hp respecto del resto de animales. En el caso de CRP e ITIH4, el valor de la mediana fue más bajo en estos animales que para los cachorros y los adultos con más de 5 años. En cambio el valor de la mediana para la Hp en el grupo de adultos jóvenes fue más alto que para el resto de los animales.

4.5 Evaluación de los niveles de PFAs en centros de protección

El objetivo de esta parte del estudio era evaluar la posibilidad de utilizar las PFAs como marcadores de bienestar animal en los centros de protección. En un primer estudio se siguió la evolución de los niveles de PFA en animales que ingresaron en tres centros de protección situados en diferentes regiones de la geografía española (centros 1, 2 y 3). Para ello se obtuvieron muestras de sangre de los animales en el momento de la llegada del animal al centro de protección, a los dos o tres días tras el ingreso en el centro, a los 15 días y un mes después de su llegada.

4.5.1 Evolución de los animales en los centros

Entre los tres centros participantes en el estudio se recogieron muestras de 61 animales. 19 animales (el 31 % del total de los animales) pertenecían al centro 1, 23 animales (el 38 %) al centro 2 y 19 animales (el 31 %) al centro 3.

Distribución de los valores de CRP a la llegada

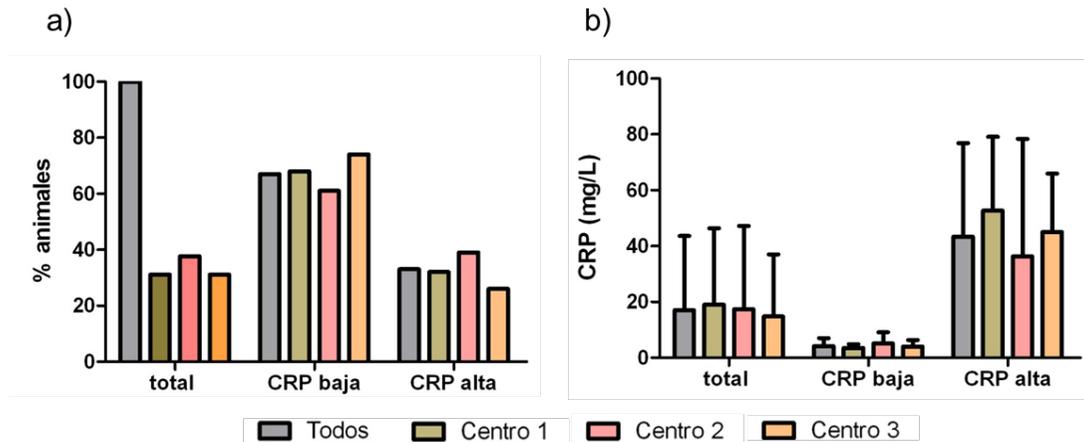


Figura 39. Distribución de los valores de CRP en los animales en el momento de la llegada al centro. a) Porcentaje de animales. b) Concentración de CRP (media \pm SD). El color de la barra indica el centro a estudio: todos los centros agrupados (gris) o cada uno de los centros por separado, centro 1 (verde), centro 2 (rosa), centro 3 (naranja). Total: todos los animales, CRP baja: animales que a la llegada presentan un valor de CRP ≤ 11 mg/L, CRP alta: animales con CRP > 11 mg/L a la llegada.

El valor promedio de la CRP en el momento de llegada a los centros, para el total de los animales fue de 17 ± 26 mg/L (media \pm SD). Además, no se observaron diferencias significativas respecto a este valor global para cada uno de los centros (Figura 39 b). Sin embargo se observó una gran variación en los valores individuales de CRP, encontrándose animales con valores de CRP dentro de la normalidad ($CRP \leq 11$ mg/L), y animales con valores elevados, incluso superando los 80 mg/L de CRP. Por esta razón se ha separado a los animales en dos grupos en función del valor de CRP que presentaron a la llegada: CRP bajo que engloba aquellos con valores de CRP dentro de la normalidad y CRP alto, grupo de animales con valores de CRP superiores a 11 mg/L.

De las 61 muestras de suero de perro recogidas a la llegada del animal al centro de protección, 20 animales (32,8 % respecto del total) presentaron valores de CRP por encima de la normalidad (valor promedio en este grupo de 43 ± 33 mg/L de CRP, media \pm SD). El porcentaje de animales que presentó valores de CRP superiores a la normalidad para cada uno de los centros es el siguiente: el 31,6 % de los animales del centro 1 (6 animales), el 39,1 % de los animales del centro 2 (9 animales) y el 26,3 % (5 animales) en el centro 3. El valor medio de CRP en estos animales no mostró diferencias significativas al comparar cada uno de los centros (Figura 39).

Distribución de los valores de ITIH4 a la llegada

El valor de ITIH4 para los 61 animales, en el momento de la llegada al centro fue de $0,44 \pm 0,19$ mg/mL (media \pm SD). No se observaron diferencias significativas respecto a este valor global, para cada uno de los centros (Figura 40 b).

Al igual que con la CRP, para evaluar el efecto de la permanencia en el centro en los valores de ITIH4, los animales se separaron en dos grupos, por una

parte animales con valores de ITIH4 dentro del rango de normalidad ($ITIH4 \leq 0,47$ mg/mL), y por otra animales con valores de ITIH4 superiores a este. El 26,2 % de los animales (16 animales respecto de los 61 totales) presentó valores de ITIH4 por encima de la normalidad, con un valor promedio de ITIH4 de $0,69 \pm 0,14$ mg/mL (media \pm SD). Este porcentaje de animales con valores de ITIH4 altos a la llegada fue el mismo en todos los centros (5 animales en el centro 1, 26,3 %; 6 animales en el centro 2, 26,1 %; y 5 animales en el centro 3, 26,3 %). El valor medio de ITIH4 para dichos animales no mostró diferencias significativas entre los centros.

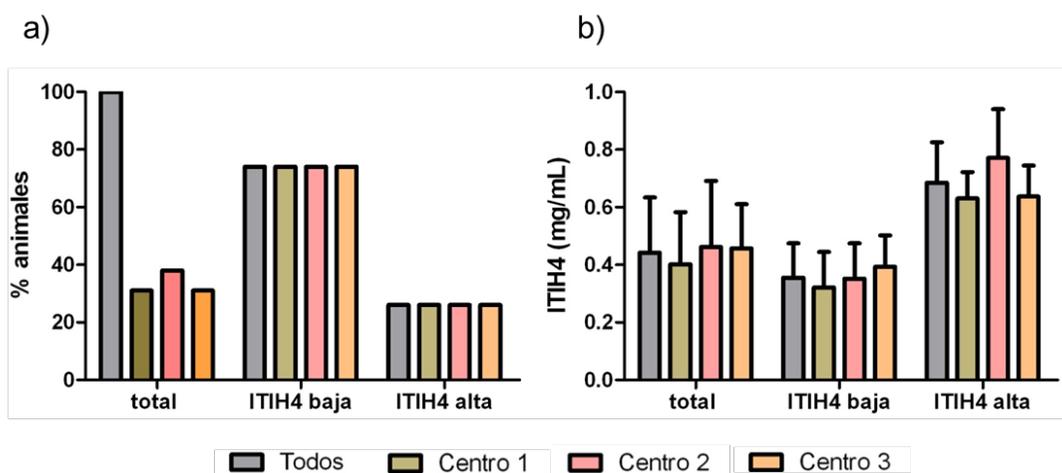


Figura 40. Distribución de los valores de ITIH4 en los animales en el momento de la llegada al centro. a) Porcentaje de animales. b) Concentración de ITIH4 (media \pm SD). El color de la barra indica el centro a estudio: todos los centros agrupados (gris) o cada uno de los centros por separado, centro 1 (verde), centro 2 (rosa), centro 3 (naranja). Total: todos los animales, ITIH4 baja: animales que a la llegada presentan un valor de ITIH4 $\leq 0,47$ mg/mL, ITIH4 alta: animales con ITIH4 $> 0,47$ mg/mL a la llegada al centro.

Distribución de los valores de Hp a la llegada al centro

El valor promedio de Hp para el total de los animales, en el momento de la llegada a los centros, fue de $1,58 \pm 1,13$ mg/mL (media \pm SD). A diferencia de lo observado para la CRP y para la ITIH4, el valor promedio de Hp a la llegada al

Resultados

centro fue diferente entre el centro 2 y 3 ($1,29 \pm 1,24$ mg/mL y $1,94 \pm 1,21$ mg/mL de Hp, respectivamente), tal y como se muestra en la figura 41.

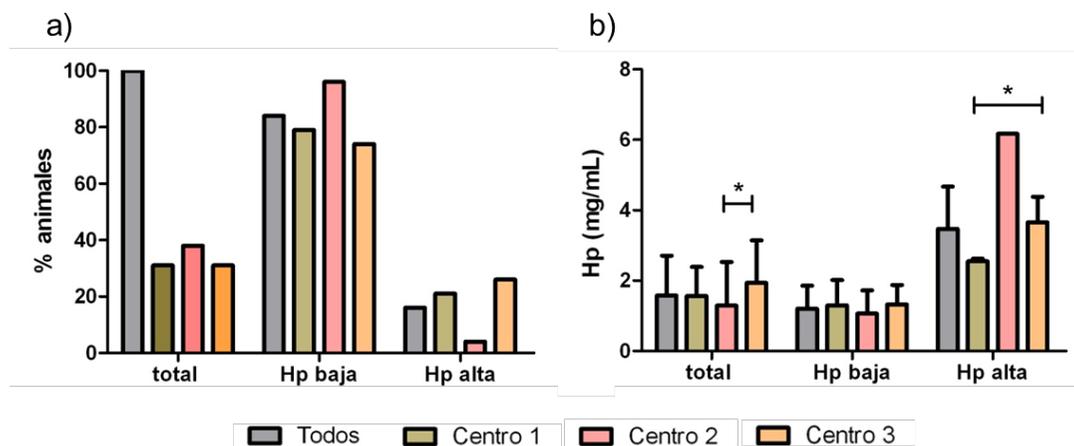


Figura 41. Distribución de los valores de Hp en los animales en el momento de la llegada al centro. a) Porcentaje de animales. b) Concentración de Hp (media \pm SD). El color de la barra indica el centro a estudio: todos los centros agrupados (gris) o cada uno de los centros por separado, centro 1 (verde), centro 2 (rosa), centro 3 (naranja). Total: todos los animales, Hp baja: animales que a la llegada presentan un valor de Hp $\leq 2,3$ mg/mL, Hp alta: animales con Hp $> 2,3$ mg/mL a la llegada. * $p < 0,05$.

Al establecer como punto de corte un valor de 2,3 mg/mL de Hp, para separar a los animales en función del valor de Hp a la llegada, el 16,4 % de los animales (10 animales) presentaron valores por encima de 2,3 mg/mL. Los porcentajes cambian al evaluar cada centro por separado. En el centro 1, un 21 % de los animales (4 animales) muestran valores de Hp superiores a la normalidad, en el centro 2 solo un animal, lo que corresponde al 4,3 % y en el centro 3, 5 animales (el 26,3 %). El valor promedio de Hp de los animales que llegaron con la Hp por encima de 2,3 mg/mL, presentó diferencias significativas entre el centro 1 y 3 ($2,55 \pm 0,07$ mg/mL y $3,68 \pm 0,73$ mg/mL de Hp, respectivamente).

Evolución de los valores de CRP durante la permanencia en el centro

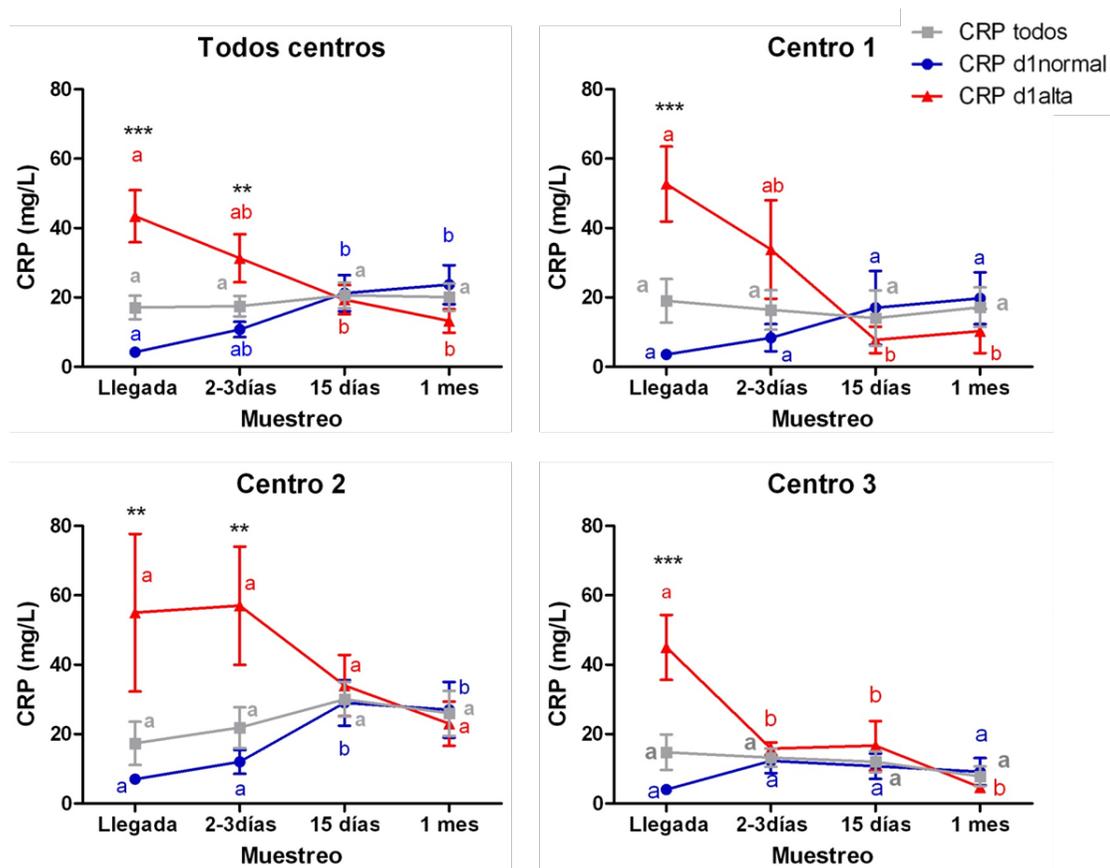


Figura 42. Evolución de los niveles de CRP durante la permanencia de los animales en los centros de protección. Serie gris agrupa a todos los animales que llegan al centro, la serie azul incluye los animales con CRP normal a la llegada, y serie roja a los animales con CRP alta a la llegada. Letras diferentes dentro de cada serie, indican puntos diferentes. Los asteriscos muestran los tiempos en los que la serie de animales con CRP d1 normal (azul) y la serie CRP d1 alta (roja) son diferentes significativamente: ** p < 0,01; *** p < 0,001.

En la Figura 42, se muestra la evolución de la CRP en el total de los animales (gris), en los animales con valores iniciales altos (rojo) y en los animales con valores iniciales bajos (azul), para el total de los centros y para cada uno de los centros por separado. Analizando los animales de todos los centros puede verse que el valor promedio de CRP de los animales que llegan al centro con

Resultados

valores altos, disminuyó durante la permanencia de los animales en los centros de protección. El grupo de animales que llegaron con valores bajos de CRP, mostró un aumento en el valor promedio. En ambos grupos los valores de CRP se igualaron a un valor medio de 21 ± 27 mg/L a los 15 días de permanencia en el centro, manteniéndose al mes.

La evolución de los valores de CRP en cada centro sigue el mismo patrón que el global para todos los centros aunque con algunas diferencias:

En el centro 1, el valor de CRP de los animales que llegaron con CRP alta disminuyó significativamente a partir de los 15 días respecto de la llegada. Los valores promedio de CRP del grupo con valores bajos no aumentaron significativamente aunque el 30 % de los animales que entraron con valores bajos, a los 15 días tenían la CRP por encima de 11 mg/L, y el 50 % al mes. Los valores de CRP para ambos grupos de animales se igualaron a los 15 días tras la entrada al centro, alcanzando un valor medio de 15 ± 33 mg/L de CRP.

En el centro 2, el grupo de animales que a la llegada presentó valores de CRP por debajo de 11 mg/L, mostró un aumento que se hizo significativo a los 15 días. Los valores de todos los animales se igualaron a este tiempo, alcanzando una concentración de CRP promedio de 30 ± 25 mg/L.

En el centro 3, la concentración de CRP del grupo de animales que presentó valores altos a la llegada, disminuyó significativamente a los 2-3 días alcanzando un valor de 16 ± 5 mg/L de CRP (media \pm SD). La concentración media de los animales que llegaron al centro con valores de CRP dentro de la normalidad, no mostró cambios significativos a lo largo de tiempo del estudio.

En la figura 43, se comparan los valores de CRP medios obtenidos a cada tiempo para cada uno de los centros.

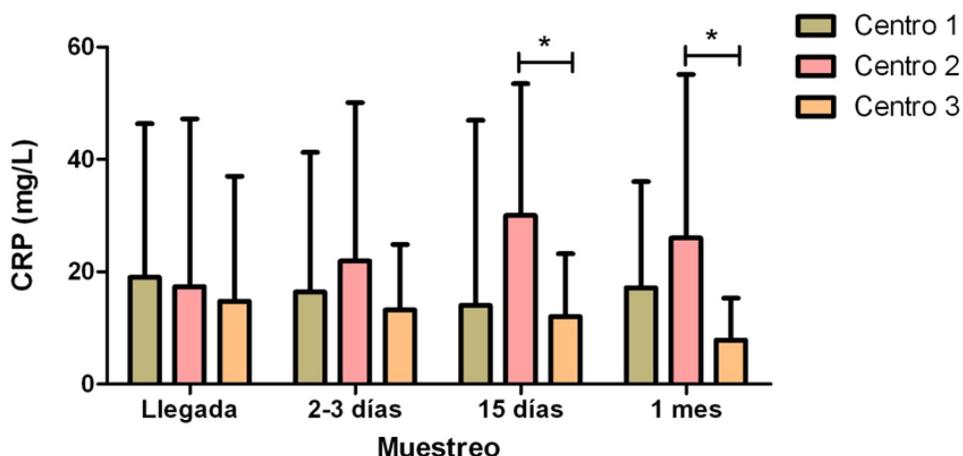


Figura 43. Comparativa de la concentración de CRP (media \pm SD) entre los distintos centros de protección, para cada tiempo de toma de muestra. * $p < 0,05$

Los valores de CRP, presentaron diferencias significativas entre el centro 2 y el centro 3 a los 15 días y al mes de la permanencia de los animales en el centro (Figura 43). Un mes después de que los animales llegaran a los centros de protección, el centro 2 es el que presentó una concentración de CRP más elevada (26 ± 29 mg/L) con un 55 % de los animales con valores de CRP por encima del valor de referencia. A este tiempo, el centro 3 presentó un valor de CRP de 8 ± 8 mg/L (media \pm SD). El 72 % de los animales en este centro presentaron valores de CRP dentro de la normalidad (≤ 11 mg/L).

Distribución de los valores de ITIH4

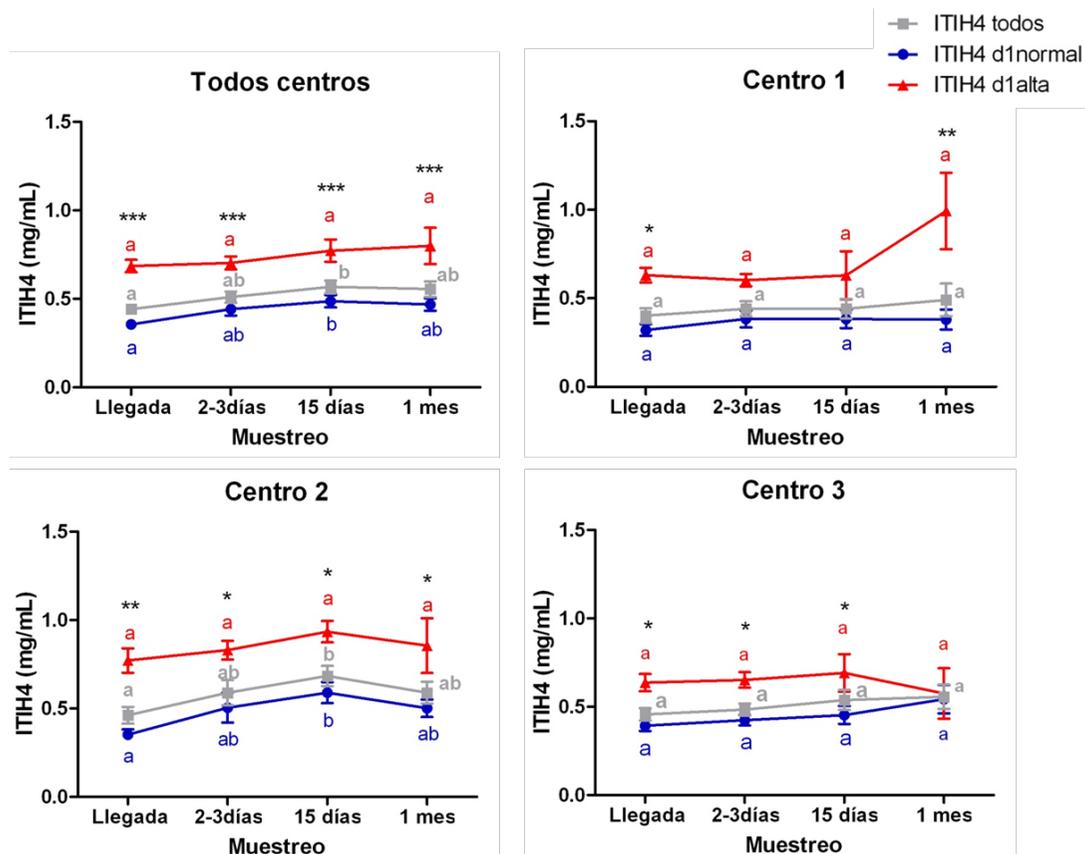


Figura 44. Evolución de los niveles de ITIH4 durante la permanencia de los animales en los centros de protección. Serie gris agrupa a todos los animales que llegan al centro, la serie azul incluye los animales con ITIH4 normal a la llegada, y serie roja a los animales con ITIH4 alta a la llegada. Letras diferentes dentro de cada serie, indican puntos diferentes. Los asteriscos muestran los tiempos en los que la serie de animales con ITIH4 d1 normal (azul) y la serie ITIH4 d1 alta (roja) son diferentes significativamente: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la gráfica que engloba los animales de todos los centros puede verse que la concentración de ITIH4 en el grupo de animales que llegó con valores de esta proteína altos (por encima 0,47 mg/mL de ITIH4) no cambió a lo largo del tiempo. El valor de ITIH4 en el grupo de animales con valores bajos, alcanzó un aumento significativo a los 15 días ($0,49 \pm 0,22$ mg/mL de ITIH4, media \pm SD),

Resultados

pero a diferencia de lo que ocurría para la CRP, el valor promedio para ITIH4 en estos animales y en los que llegaron con la ITIH4 alta no se igualó. La evolución de todos los animales, mostró un aumento significativo en la concentración de ITIH4 a los 15 días respecto de la llegada.

Analizando los datos de manera individual para cada centro se observan ligeras diferencias. En el centro 1 los valores promedio de ITIH4 no cambiaron con el tiempo, ni en el grupo de animales que llegaron al centro con valores de ITIH4 altos, ni en los que pertenecían al grupo de valores de ITIH4 bajo. La evolución del promedio de ITIH4 para todos los animales en este centro mostró los mismos resultados.

Los animales del centro 2, mostraron un aumento en los niveles de ITIH4 a los 15 días de permanencia en el centro, con un valor promedio para todos los animales del centro de $0,68 \pm 0,27$ mg/mL de ITIH4. La misma evolución presentaron los animales que llegaron al centro con niveles bajos de ITIH4. Los animales que a la llegada presentaron valores altos de ITIH4, mantuvieron los valores de ITIH4 elevados.

La evolución de los valores de ITIH4 en los animales del centro 3, es similar a la que presentaron los animales del centro 1. Los valores de concentración de ITIH4 no cambiaron a lo largo del tiempo, ni para el total de los animales, ni para los grupos de animales que llegan con ITIH4 alta o baja, aunque un mes después de la llegada el valor promedio de ITIH4 en ambos grupos se igualó.

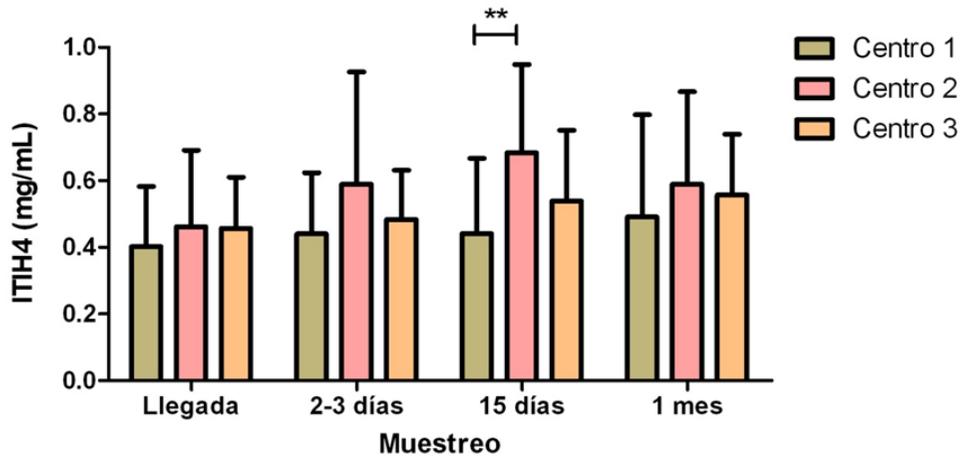


Figura 45. Comparativa de la concentración de ITIH4 (media \pm SD) entre los distintos centros de protección, para cada tiempo de toma de muestra. ** $p < 0,01$

A los 15 días de la llegada de los animales a los centros de protección se observaron diferencias significativas en la concentración de ITIH4 entre los centros 1 y 2, donde los valores de ITIH4 (media \pm SD) fueron $0,44 \pm 0,22$ mg/mL y $0,68 \pm 0,27$ mg/mL, respectivamente. Para el resto de tiempos los valores de ITIH4 que se encontraron fueron próximos al valor de referencia establecido para los animales sanos ($0,47$ mg/mL ITIH4), no observándose diferencias entre centros.

Evolución de los valores de Hp

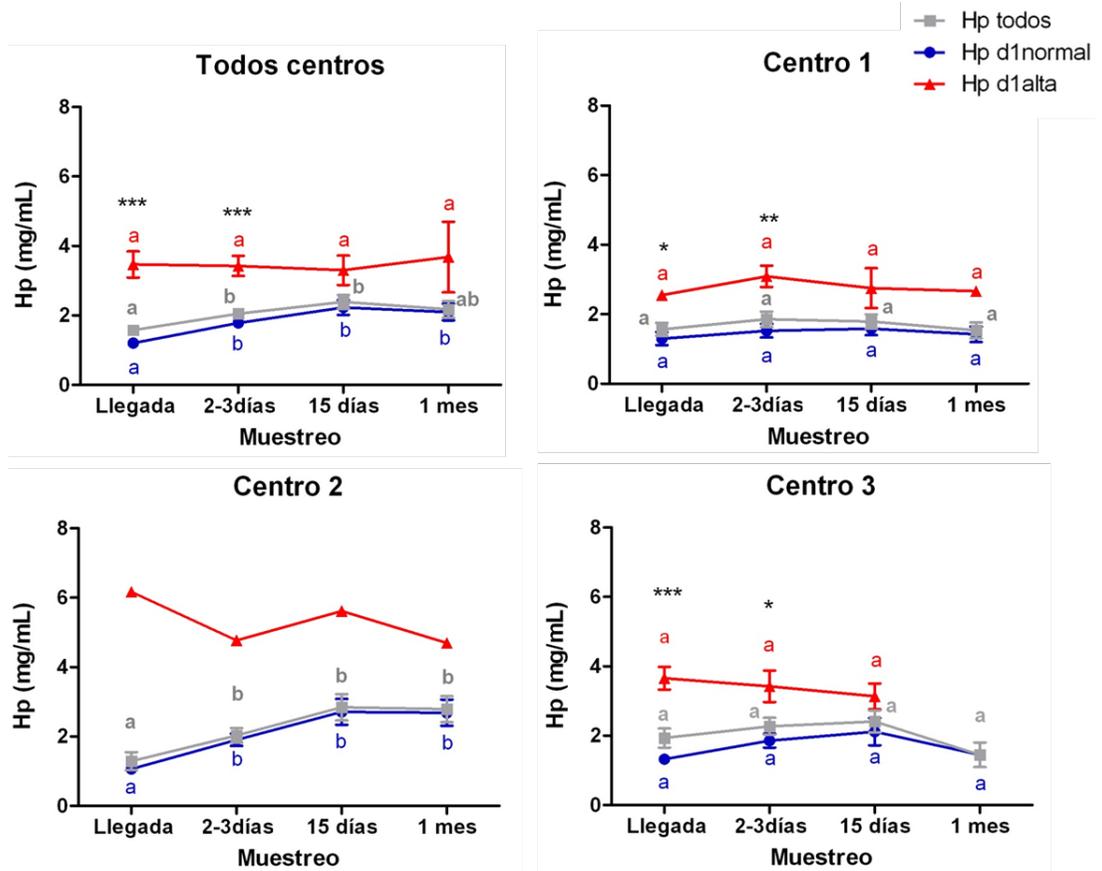


Figura 46. Evolución de los niveles de Hp durante la permanencia de los animales en los centros de protección. Serie gris agrupa a todos los animales que llegan al centro, la serie azul incluye los animales con Hp normal a la llegada, y serie roja a los animales con Hp alta a la llegada. Letras diferentes dentro de cada serie, indican puntos diferentes. Los asteriscos muestran los tiempos en los que la serie de animales con Hp d1 normal (azul) y la serie Hp d1 alta (roja) son diferentes significativamente: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los valores de concentración de Hp para todos los animales, analizando todos los centros en conjunto (Figura 46, arriba izquierda), mostraron diferencias significativas a los 2-3 días y a los 15 días respecto de la llegada. En ambos

Resultados

tiempos se alcanzaron valores de $2,0 \pm 1,0$ mg/mL y $2,4 \pm 1,4$ mg/mL de Hp respectivamente. Los animales que a la llegada a los centros tenían valores de Hp dentro del rango de normalidad establecido para esta proteína ($\leq 2,3$ mg/mL de Hp), presentaron la misma evolución que la curva general (gris) mostrada por todos los animales, con diferencias significativas del valor de Hp en todos los tiempos respecto de la llegada. Por el contrario, el valor promedio de Hp en los animales que llegaron a los centros con valores altos, no cambió a lo largo del tiempo.

Los valores de concentración de Hp en los animales del centro 1, no mostraron diferencias significativas a lo largo del tiempo. Tanto los animales que llegaron con valores altos, como que presentaron valores normales a la llegada al centro, los mantuvieron, y en ningún caso presentaron un aumento en el valor promedio de Hp.

En el centro 2, solo un animal llegó con valor de Hp por encima de 2,3 mg/mL. Los animales en este centro, experimentaron un aumento significativo a partir de los 2-3 días de la llegada al centro, alcanzando un valor máximo de $2,8 \pm 1,7$ mg/mL de Hp a los 15 días y manteniéndose dicho valor elevado hasta el final del estudio.

En el centro 3 los animales que llegaron con valores altos de Hp mantuvieron los valores por encima de 2,3 mg/mL, sin mostrar variaciones significativas en sus valores. El grupo de animales que llegó al centro con valores bajos de Hp no aumentó sus valores promedio. De manera general para este centro, los animales no presentaron cambios en el promedio de la concentración de Hp a lo largo del tiempo, como se ha visto en el centro 1.

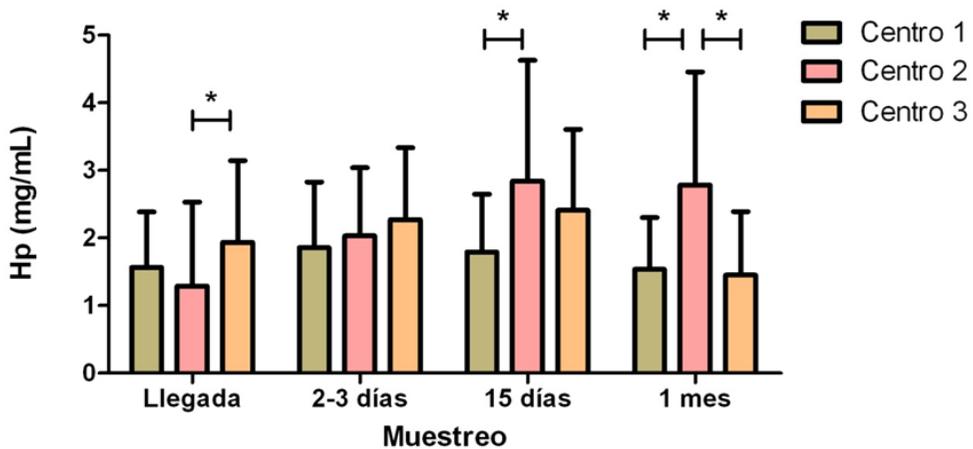


Figura 47. Comparativa de la concentración de Hp (media \pm SD) entre los distintos centros de protección, para cada tiempo de toma de muestra. * $p < 0,05$

En la figura 47, puede verse que el valor promedio de Hp que presentaron los animales del centro 3 a la llegada ($1,9 \pm 1,2$ mg/mL de Hp) fue superior que el de los animales del centro 2 ($1,3 \pm 1,2$ mg/mL). Debido al aumento del valor promedio de Hp en el centro 2, y a la no modificación de los valores de Hp en los centros 1 y 3, los valores promedio de Hp se igualaron entre los centros tras 2-3 días de permanencia en el centro. A los 15 días, el valor medio de Hp en el centro 2 fue significativamente más alto que en el centro 1. Al mes de permanencia el valor de Hp en el centro 2 fue significativamente más alto ($2,8 \pm 1,7$ mg/mL de Hp) que el encontrado en los centros 1 y 3 ($1,5 \pm 0,7$ mg/mL y $1,5 \pm 0,9$ mg/mL de Hp respectivamente).

Parámetros o características de los centros de protección

Para evaluar si las diferencias en de los valores de las PFAs encontrados entre los distintos centros, pueden asociarse a alguna característica propia de los centros, a continuación se muestra una tabla donde se recogen parámetros diferentes entre los tres centros.

Resultados

Tabla 20. Características de los centros de protección

	Centro 1	Centro 2	Centro 3
Tamaño del chenil	5 m ²	6,8 m ²	3 m ²
Tipo de chenil	Individual	Individual	Compartido
Comida en el chenil	Si	No	Si
Zona de ejercicio común	No	No	Si
Paseos	Paseo diario	No paseo	Paseo diario
Frecuencia paseo	1 vez x 15 min	---	2 veces x 10 min
Estímulos auditivos	Fuertes, próximos y puntuales	Fuertes, próximos y permanentes	No

En el centro 1, los animales se alojan en un espacio de 5 m² sin compartir el espacio y tienen comida en el chenil, pasean una vez al día y están sometidos a estímulos auditivos fuertes, próximos y puntuales. Estos animales tras 15 días de permanencia en el centro presentaron valores de CRP superiores a 11 mg/L y valores de Hp por debajo del 2,3 mg/mL.

En el centro 2 donde los animales no pasean, no poseen comida en el chenil y además están sometidos a estímulos auditivos fuertes, próximos y permanentes, a partir de los 15 días de permanencia en el centro, los animales presentaron valores CRP y Hp superiores a 11 mg/L de CRP y a 2,3 mg/mL de Hp, aunque en este centro los animales están alojados en cheniles amplios (6,8 m²) y no comparten el espacio con otros.

En el centro 3, los animales presentaron valores de CRP por debajo de 11 mg/L y de Hp por debajo de 2,3 mg/mL. En este centro los animales están alojados en un espacio más pequeño 3 m² y que comparten, pasean 2 veces al día, tienen comida dentro del chenil y además no están sometidos a estímulos auditivos de ningún tipo.

4.5.2 Niveles de CRP en animales alojados en centros de protección animal. Estudio 2.

En un estudio adicional se ha determinado la CRP, en muestras de sueros de animales alojados en 11 centros de protección, en el que se realizó una única toma de muestra de cada animal. En el estudio se incluyeron animales que acababan de llegar al centro, y animales que llevaban alojados más de 15 días en al mismo. Utilizando fichas normalizadas (Anexo Figura 1), se recogieron los parámetros propios de cada animal (edad, raza sexo, comportamiento, sintomatología clínica...), los parámetros relativos a las características del centro y el tiempo de permanencia del animales en el centro hasta la toma de muestra.

Forma de llegada al centro

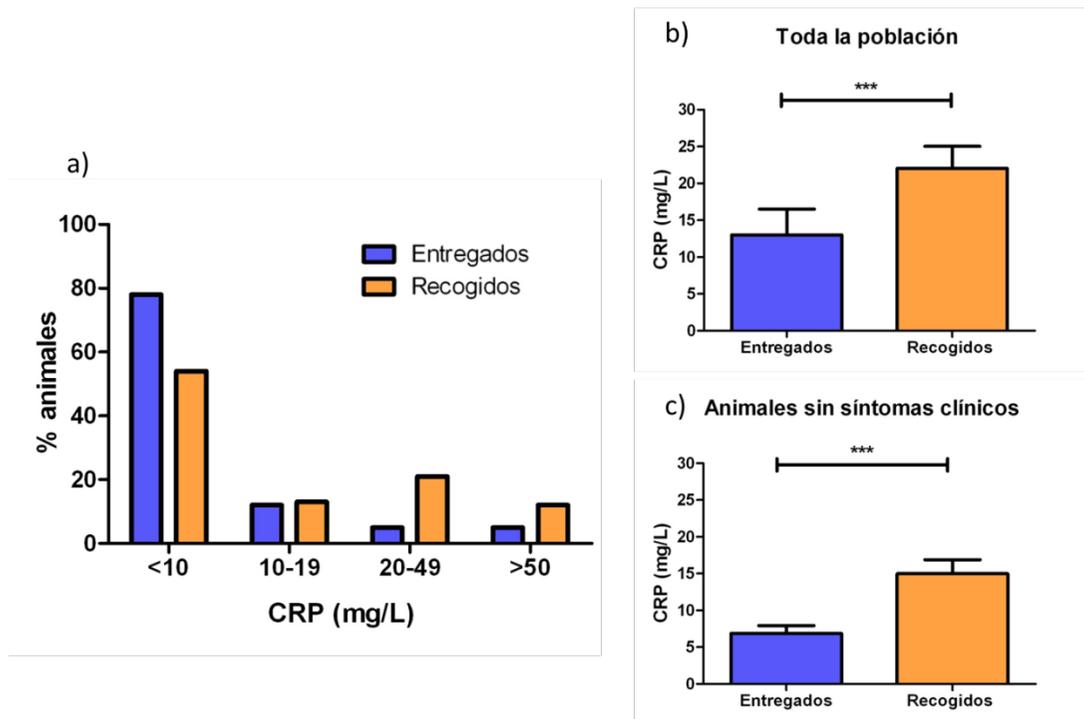


Figura 48. Comparativa de los valores de CRP en los animales entregados y recogidos en los centros de protección. a) Porcentaje de animales entregados y recogidos, en función de la concentración de CRP. b) Valor de CRP (media ± SEM) de los

Resultados

animales entregados y recogidos. c) Valor de CRP (media \pm SEM) de los animales entregados y recogidos que no presentan sintomatología clínica. *** $p < 0,001$.

La llegada de los animales a los centros de protección puede realizarse de dos formas, los animales pueden ser entregados por el dueño o pueden ser recogidos por los servicios municipales o de la protectora de animales correspondiente. En el estudio se determinó la concentración de CRP en el momento de la llegada del animal al centro, en 85 animales entregados y en 124 animales recogidos. En la figura 48 a, puede verse que el 78 % de los animales entregados presentaron valores inferiores a 10 mg/L de CRP. Sin embargo este porcentaje fue menor para los animales recogidos (un 54 % de los animales recogidos con CRP < 10 mg/L). El grupo de animales recogidos presentó un valor medio de CRP significativamente mayor que el grupo de animales entregados (22 mg/L y 13 mg/L de CRP, respectivamente). Esta diferencia significativa entre ambos grupos se mantuvo al eliminar los animales que presentaban sintomatología clínica (Figura 43 b, c). El valor medio de CRP en los animales entregados que no presentaban ningún tipo de sintomatología clínica fue 6,8 mg/L de CRP y el de los animales recogidos 15 mg/L de CRP.

Concentración de CRP en función del estado nutricional

Los animales fueron clasificados en función de su estado nutricional en: animales muy delgados (n=9), animales delgados (n=42), animales normales (n=312) y animales obesos y con sobrepeso (n=17). El efecto del estado nutricional sobre la concentración de CRP se determinó tanto para el total de la población como para aquellos animales que no presentaban signos clínicos (Figura 49). Para toda la población, los animales muy delgados mostraron un valor medio de CRP de 34 mg/L, significativamente superior al que mostraron los animales normales (17 mg/L) y al de los animales obesos y con sobrepeso (25 mg/L). Al eliminar de la comparativa los animales con síntomas clínicos, se

observó una relación entre los valores de CRP y el estado nutricional: valores de CRP más elevados se asocian a los animales muy delgados y los valores más bajos a animales obesos o con sobrepeso. Sin embargo las diferencias significativas de los valores de CRP entre los grupos solo se mantienen entre los animales delgados (n=13) y normales (n=213), cuyos valores medios de CRP son 19,6 mg/L y 12,4 mg/L, respectivamente. Estas diferencias no se observaron en el caso de los animales muy delgados (n=8) y obesos y con sobrepeso (n= 9), posiblemente debido al bajo número de animales.

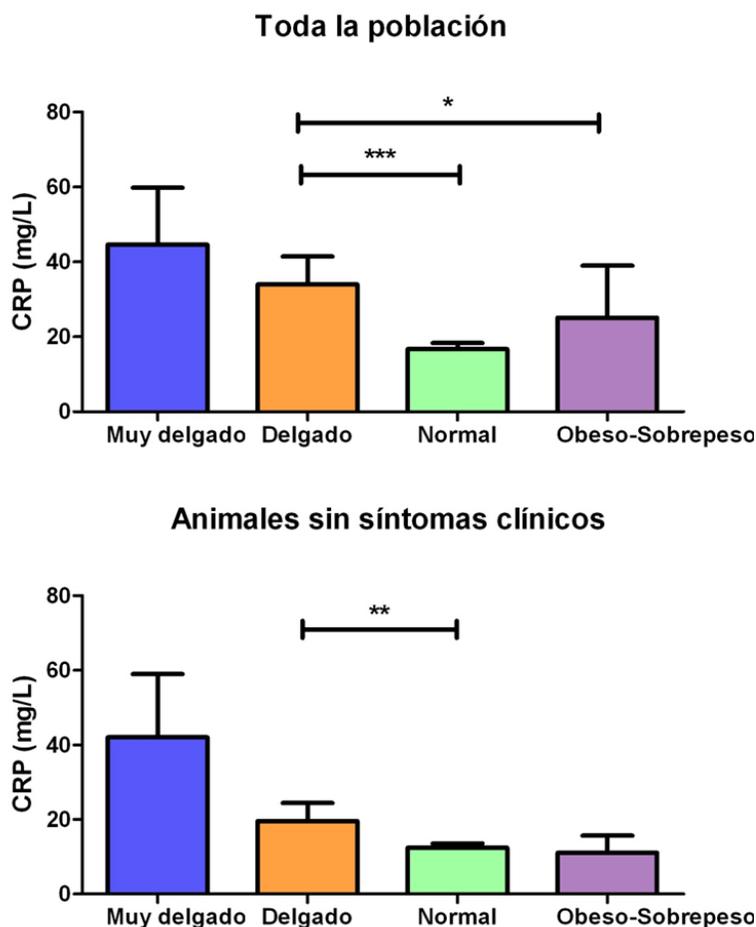
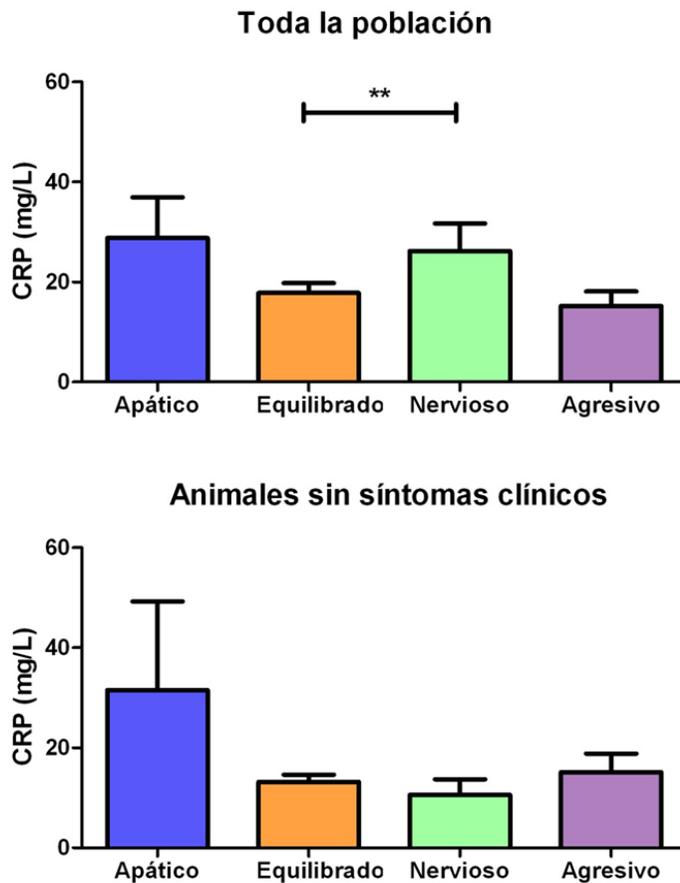


Figura 49. Valores de CRP en los animales agrupados en función de su estado nutricional: Muy delgado, delgado, normal y obeso-sobrepeso. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$**

Comportamiento

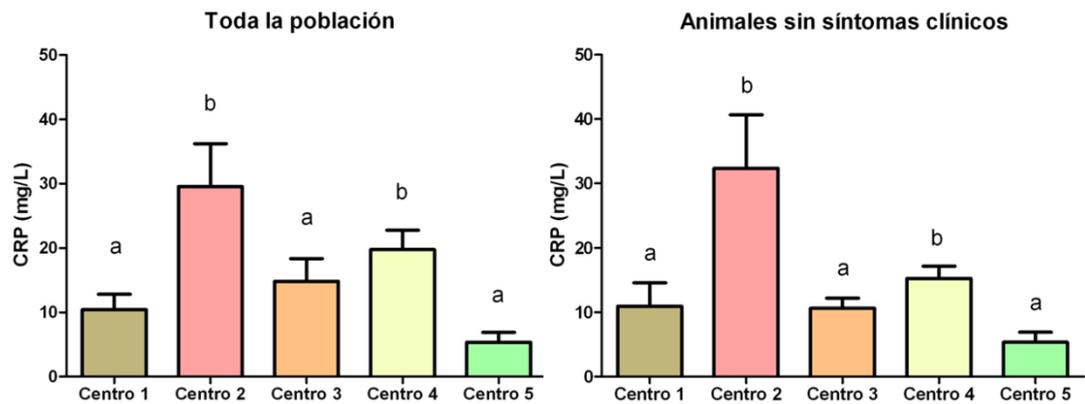
Los animales se agruparon en cuatro categorías de acuerdo al comportamiento que mostraban: apático (n=21), equilibrado (n=274), nervioso (n=61) y agresivo (n=24). Al evaluar toda la población los animales nerviosos presentaron un valor promedio de CRP significativamente superior que el de los animales equilibrados (26,4 y 17,8 mg/L, respectivamente). Al evaluar los animales que no mostraban sintomatología clínica, no se vio una relación entre el comportamiento de los animales y la CRP, ya que el análisis mediante el test Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura 50).



Resultados

Figura 50. Valores de CRP en los animales agrupados en función de su comportamiento: apático, equilibrado, nervioso y agresivo. ** p<0,01.

Comparativa por centros



	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 4	Centro 5
Tamaño del chenil	5 m ²	6,8 m ²	3 m ²	9 / 22 m ²	8 m ²
Tipo de chenil	Individual	Individual	Compartido	Individual / Compartido	Individual
Comida en el chenil	Si	No	Si	Si	Si
Zona de ejercicio común	No	No	Si	No	No
Paseos	Diario	No paseo	Diario	Semanal	Diario
Frecuencia paseo	1 vez x 15 min	---	2 veces x 10 min	2 veces x 60 min	2 veces x 30 min
Estímulos auditivos	Fuertes, próximos y puntuales	Fuertes, próximos y permanentes	No	Próximos y permanentes	Fuertes, próximos y permanentes

Figura 51. Valor promedio de CRP para los animales alojados en cada uno de los centros participantes en el estudio y características de cada centro. a, b: indican diferencias significativas entre centros.

Para evaluar si entre los diferentes centros de protección se encuentran diferencias en cuanto a los niveles de CRP, se determinó su concentración en animales que llevaran alojados en el centro al menos 15 días. Esta comparativa pudo realizarse en un total de 5 centros.

Se encontraron diferencias significativas en los valores de CRP entre los distintos centros (Figura 51). Al eliminar los animales que presentan sintomatología clínica, las diferencias entre los centros se mantienen. El centro que mayor valor de CRP mostró fue el centro 2, seguido del 4 y de los centros 1, 3 y 5.

Las mayores diferencias respecto al valor de CRP se han visto entre el centro 2 y el centro 5. El centro que mayor valor de CRP presenta es el 2, en el cual los animales están sometidos a estímulos fuertes, próximos y permanentes, en el centro 5 los animales también están sometidos al mismo tipo de estímulos auditivos, sin embargo la concentración de CRP en este centro es mucho menor. Las diferencias entre ambos centros son, presencia o ausencia de comida en el chenil y si los animales pasean o no. En el centro 2, los animales no tienen comida en el chenil, y al no disponer de voluntarios en el centro no pasean.

Los valores de CRP del centro 4, son significativamente más elevados que los de los centros 1, 3 y 5. En los cuatro centros, todos los animales presentan rutina de paseo, sin embargo en el grupo 4 los animales pasean semanalmente, mientras que en los centros 1, 3 y 5 lo hacen de forma diaria. No se han visto diferencias entre los centros de los animales que pasean diariamente, aunque el tiempo de paseo de estos sea distinto.

Los centros 1, 3 y 5, además de presentar diferencias en cuanto el tiempo de paseo de los animales, presenta diferencias en cuanto a cómo se alojan los animales en el chenil, individual o compartido y tamaño del chenil, pero no se ha

Resultados

encontrado una asociación de los valores de CRP en función de estas características, entre estos tres centros.

En la figura 52 se representan los valores de CRP para el total de la población estudiada (población global y población sin sintomatología clínica) en función de si los animales pasean o no de si el paseo es semanal o diario.

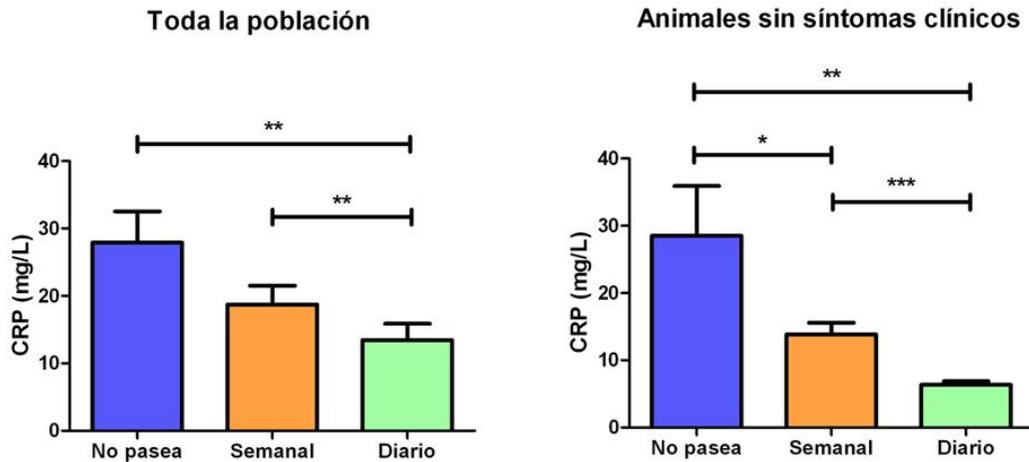


Figura 52. Valores de CRP en función de la frecuencia del paseo en toda la población y en animales sin sintomatología clínica. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los animales que no pasean presentan los valores de CRP más elevados, seguidos de los animales que pasean semanalmente y por último los animales que pasean diariamente. Estas diferencias se observan tanto para el total de la población, como para los animales sin sintomatología clínica. El grupo de animales sin síntomas clínicos que pasean diariamente presentan los valores de CRP más bajos y además estos valores están dentro del rango de valores de referencia establecido para animales sanos.

5 DISCUSIÓN

5.1 Purificación de proteínas y obtención de antisueros

Como etapa previa al desarrollo de métodos analíticos, el primer objetivo de esta tesis ha sido la purificación de algunas de las principales PFAs caninas conocidas (CRP, Hp y GPA), así como de la ITIH4, cuyo comportamiento durante la fase aguda en esta especie era desconocido, puesto que esta proteína ha sido aislada y caracterizada por primera vez durante esta tesis.

Tras la optimización de los métodos de purificación, se ha logrado disponer de preparaciones de cada una de estas proteínas bien caracterizadas y con un elevado grado de pureza, todas las proteínas fueron identificadas mediante Maldi-TOF, y en el caso de la ITIH4 se obtuvo una doble confirmación, al identificarla también, mediante LC-MS/MS. Las preparaciones obtenidas tras cada purificación han podido usarse como patrón en los inmunoensayos, y como inmunógeno para la obtención de anticuerpos específicos.

La metodología abordada para las distintas purificaciones llevadas a cabo varía en función de la proteína a estudio. En el caso de las purificaciones de ITIH4 y CRP, ha sido posible completar los aislamientos en una sola etapa mediante el uso de columnas de afinidad, en cambio, las purificaciones de Hp y GPA, han requerido una sucesión de etapas hasta lograr una preparación lo suficientemente pura.

Purificación de ITIH4

La purificación de ITIH4 canina a partir de anticuerpos anti Pig-MAP, ha sido posible gracias a la reactividad cruzada presente entre ambas especies. En una comparativa entre las secuencias de aminoácidos obtenidas de la base de datos NCBI de la Pig-MAP, la ITIH4 bovina y la ITIH4 humana, todas ellas presentan una homología del 72 % con la ITIH4 canina y superior o igual al 70 % al compararlas entre sí (Tabla 21).

Discusión

La homología de la ITIH4 con las cadenas pesadas de la familia ITI, está restringida a los dos primeros tercios de la secuencia desde el extremo amino terminal, donde se encuentra un sitio de unión a calcio, un dominio von Willebran tipo A y un dominio vault (Saguchi et al., 1995). La ITIH4 es una proteína conservada entre las diferentes especies. La homología de esta proteína entre las diferentes especies no está restringida únicamente al extremo amino terminal, sino que se muestra en toda la proteína.

% identidad AA iguales	Cerdo	Humano	Vaca	Perro
Cerdo		72	75	72
Humano	753		70	72
Vaca	770	770		72
Perro	743	763	746	

La purificación de ITIH4 canina se ha realizado mediante una cromatografía de afinidad. Este procedimiento es un método rápido y sencillo que ha permitido purificar la ITIH4 canina en una sola etapa a diferencia de los diversos procedimientos descritos en la literatura para la purificación de esta proteína en otras especies, como es el caso de la ITIH4 humana (Hammer et al., 1989; Pu et al., 1994), la Pig-MAP/ITIH4 porcina (Gonzalez-Ramon et al., 1995; Pu et al., 1995) o la ITIH4 bovina (Piñeiro et al., 2004) los cuales constan de varias etapas cromatográficas.

La ITIH4 purificada en las diferentes especies estudiadas (Hammer et al., 1989; Pu et al., 1994; Choi-Miura et al., 1995; Gonzalez-Ramon et al., 1995; Piñeiro et al., 2004) ha mostrado una notable susceptibilidad a la proteólisis durante su purificación. Sin embargo en el procedimiento utilizado en esta tesis para la purificación de la ITIH4 canina, no se ha observado degradación de la

proteína, a pesar de que este método requiere medio ácido en la etapa de elución.

Purificación de CRP

En este trabajo, la CRP canina ha sido purificada siguiendo el mismo principio descrito por Fujise (1992), mediante una columna de afinidad de *p*-aminofenil fosforilcolina favoreciendo la unión de la CRP al ligando en presencia de calcio y eluyendo la CRP al retirar dicho calcio. Inicialmente, la CRP canina fue purificada aprovechando su capacidad de unión al polisacárido C del neumococo, mediante el uso de una cromatografía de afinidad dependiente de calcio (Caspi et al., 1984). Más tarde, pasó a usarse la fosforilcolina como ligando en dicha cromatografía de afinidad (Fujise et al., 1992), este uso había dado buen resultado en la purificación de la CRP humana (Stults et al., 1987), con una mejora en el grado de pureza de la proteína obtenida.

La CRP purificada presentó dos bandas mediante electroforesis SDS-PAGE de 28 y 24 KDa, estas dos bandas coincidían con las descritas previamente para la CRP canina en un gel reductor (Caspi et al., 1984). La CRP es una pentraxina formada por 5 monómeros. En el caso de la CRP canina dos de esos cinco monómeros están glicosilados, por lo que mediante electroforesis desnaturante se observan dos bandas de diferente peso molecular, a diferencia de la CRP humana que no está glicosilada y solo muestra una banda.

La CRP purificada, además de utilizarse para la producción de antisueros que han permitido desarrollar un método inmunturbidimétrico (Piñeiro et al., 2018), también ha servido para desarrollar un material de referencia que permita la armonización de los resultados analíticos obtenidos por diferentes métodos de medida (Canalias et al., 2018).

Purificación de Haptoglobina

La purificación de la Hp de perro se ha llevado a cabo mediante una etapa de enriquecimiento a partir de precipitación fraccionada con sulfato amónico, y

una sucesión de etapas cromatográficas. Aunque es un procedimiento laborioso, se ha preferido a la alternativa de la purificación en una sola etapa mediante cromatografía de afinidad con hemoglobina, como previamente se ha descrito para la purificación de Hp en otras especies como vaca y cerdo (Morimatsu et al., 1991; Lampreave et al., 1994), por utilizar condiciones menos drásticas en cada una de las etapas de purificación. El método de purificación seleccionado en esta tesis no ha supuesto una modificación sustancial respecto de la primera purificación de Hp canina que se tiene constancia (Dobryczycka et al., 1969). La principal diferencia es que el método de Dobryczycka (1969) utiliza una primera etapa de enriquecimiento basada en la cromatografía de intercambio iónico, mientras que en nuestro caso, la precipitación fraccionada del suero de perro con sulfato amónico saturado nos permitió obtener una fracción de suero con una mayor proporción de Hp y la columna de Azul de Cibacron-Sepharose 4B retirar gran parte de la albúmina, proteína mayoritaria del suero y que también se encontraba en la fracción precipitada. Ambos métodos el de Dobryczycka y el abordado en esta tesis comparten la etapa final, donde mediante una o varias cromatografías de exclusión molecular de Sephacryl S-200, se consigue aumentar la pureza de la Hp en la preparación. La Hp canina purificada, mostró una banda a 34 KDa y otra de menor intensidad a 18 KDa (Figura 7) mediante electroforesis desnaturante, coincidiendo respectivamente con la cadena pesada y la cadena ligera (o subunidades β y α) descritas para esta proteína en la especie canina (Kumazaki et al., 1992).

Purificación de GPA

La purificación de la GPA se llevó cabo aprovechando características destacables de esta glicoproteína, como su alta solubilidad, y su bajo punto isoeléctrico (pI 3,2- 3,6) en comparación del resto de proteínas presentes en el suero. La metodología llevada a cabo en este trabajo para la purificación de la GPA canina, es comparable a la descrita con anterioridad por otros autores (Dello et al., 1987; Yuki et al., 2008), en la que la principal etapa consiste en retirar la mayor cantidad de proteínas del suero con un agente precipitante, ácido sulfosalicílico Dello (1987), sulfato amónico Yuki (2008), disolución de sulfato

amónico junto con TCA en el presenta trabajo. El paso de la fracción no precipitada por una columna de intercambio iónico ha permitido eliminar trazas de otras proteínas contaminantes y obtener una preparación de elevada pureza que, mediante electroforesis SDS, solo muestra una banda de un peso molecular por encima de 42 KDa, tal y como ha sido descrito previamente (Yuki et al., 2008).

Desarrollo de antisueros

Las proteínas purificadas (ITIH4, CRP, Hp y GPA) se utilizaron para inmunizar conejos y obtener antisueros. Como paso previo al desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de las diferentes PFA, se comprobó que los antisueros no presentaran reacciones inespecíficas. En el caso del antisuero anti GPA, la especificidad que mostró mediante inmunolectroforesis (Figura 13) se consideró adecuada, por lo que no fue necesario inmunoadsorberlo. Los antisueros anti ITIH4, anti Hp y anti CRP al enfrentarlos a un suero de perro, además de la proteína de interés, reconocían otras proteínas. Para inmunoadsorber estos antisueros, se aprovecharon las fracciones de suero carentes de la proteína a estudio, obtenidas tras los procesos de purificación (apartado 3.6.1.2). Finalmente, los antisueros obtenidos reconocieron de manera satisfactoria a la proteína de interés, tanto purificada como en el suero, no mostrando reacciones cruzadas con otras proteínas séricas.

5.2 Desarrollo y validación de métodos analíticos

Una parte importante de esta tesis, ha consistido en el desarrollo de métodos analíticos robustos y adecuadamente validados para la cuantificación de PFAs en suero de perro. En todos los casos, los métodos desarrollados se basan en el uso de anticuerpos y estándares específicos de la especie canina, desarrollados previamente.

Inmunodifusión radial

En una primera etapa se desarrollaron y validaron métodos de inmunodifusión radial para cada uno de los antisueros obtenidos. La cuantificación de proteínas se realizó inicialmente mediante inmunodifusión radial, al ser un método directo y sencillo de desarrollar una vez que se dispone de los antisueros específicos, que no requiere la inmunopurificación de los anticuerpos. Además es un método bastante preciso, como puede comprobarse en los ensayos desarrollados en esta tesis, que mostraron CV intra e inter ensayo, no superando el 7 % para ninguna de las proteínas estudiadas.

Sin embargo, este método de medida presenta algunas limitaciones. Es un método laborioso y no es inmediato, dado que es necesario dejar difundir las muestras al menos 48 horas para que se forme el anillo de precipitación. Por esta razón, se ha decidido desarrollar métodos que permitan procesar más fácilmente una mayor cantidad de muestras y obtener los resultados de una manera más rápida. Otra de sus limitaciones es su baja sensibilidad. Para la determinación de ITIH4, no ha supuesto un problema, puesto que los valores de esta proteína en el suero canino están por encima de ese valor. Sin embargo en el caso de CRP, donde el LoQ se estableció en 6 mg/L, no es posible determinar los valores de esta proteína en sueros de animales sanos.

ELISA para la cuantificación de ITIH4 canina

En esta tesis se ha desarrollado por primera vez un método ELISA para la cuantificación de la ITIH4 canina. El método desarrollado es un ELISA tipo sándwich, con anticuerpos policlonales inmunopurificados a partir de los antisueros. Los resultados de la validación muestran que es un método preciso y fiable, que presenta una buena correlación con la inmunodifusión radial.

Los estudios de validación del método ELISA para la ITIH4 canina mostraron una imprecisión similar a la obtenida para la inmunodifusión radial (menor del 6 % para intra ensayos y menor del 7 % para inter ensayos). Además de la característica anteriormente mencionada que es la rapidez, este método presenta otras ventajas respecto de la técnica de IR previamente desarrollada.

En las condiciones analíticas seleccionadas para cada uno de los métodos, el LoQ del ELISA para ITIH4 en muestras de suero es inferior (0,08 mg/mL) que el de IR (0,11 mg/mL), además el rango analítico del ELISA es mayor que el de la IR (0,08 - 2,8 mg/mL y 0,11 - 1,4 mg/mL respectivamente).

Hasta la fecha, no se han encontrado datos previos de cuantificación de ITIH4 canina en la literatura. Los métodos analíticos desarrollados en esta tesis han permitido, por tanto, determinar por primera vez su concentración en suero de perro. Un valor de 2,8 mg/mL de ITIH4, es elevado para los valores de concentración de esta proteína determinados a lo largo de esta tesis en los diferentes estudios realizados, por lo que el rango de trabajo del ELISA permitiría a priori cuantificar la ITIH4 en suero de perros sanos y con patologías. No obstante, si el nivel de absorbancia obtenido en el ELISA para una muestra problema fuese superior al obtenido para el calibrador de mayor concentración, podría hacerse una pre-dilución de la muestra para que esta cayese dentro del rango de cuantificación del ensayo. Igualmente todas las muestras determinadas a lo largo de esta tesis presentaron valores superiores al límite de cuantificación del ensayo (0,08 mg/mL de ITIH4).

Los estudios de linealidad realizados indican que el ELISA cuantifica de forma proporcional en el rango de trabajo seleccionado. Además se evaluó la veracidad del ensayo realizando una comparativa con la inmunodifusión radial previamente validada. El análisis mediante regresión lineal mostró una adecuada correlación entre ambos métodos. La pendiente de la recta de regresión no fue diferente de uno, por lo que no se observó la presencia de error proporcional. Aunque el intervalo de confianza de la ordenada en el origen (0,009 – 0,108 mg/mL de ITIH4) no incluiría el cero, la diferencia es mínima e irrelevante desde el punto de vista clínico analítico.

En definitiva se ha desarrollado un ELISA para la determinación de la ITIH4 canina que presenta una adecuada precisión y especificidad. Podemos considerar por tanto que el ELISA desarrollado representa una alternativa adecuada al método de IR, con las ventajas anteriormente mencionadas.

ELISA para la cuantificación de Hp canina

A partir de los antisueros anti Hp caninos obtenidos tras la inmunización de la Hp en conejos, se purificaron anticuerpos anti Hp caninos. Estos anticuerpos permitieron desarrollar un ELISA tipo sándwich para determinar la concentración de Hp en muestras de suero de perro. El ELISA desarrollado presentó una adecuada precisión y especificidad para cuantificar Hp en muestras de suero de perro, utilizando anticuerpos específicos de especie.

Los ensayos de validación del método ELISA para la Hp de perro mostraron una buena precisión, con CV intra ensayo similares a los obtenidos por la IR (inferiores al 5 %). En el caso de los CV inter ensayo obtenidos la IR presentó menor imprecisión respecto del ELISA, no superando este último el 10,6 %.

De acuerdo con el rango analítico establecido, una dilución 1:50000 de las muestras de suero de perro, permite cuantificar sueros con valores de Hp comprendidos entre 0,20 y 6,58 mg/mL. Este rango supone un aumento respecto del establecido para la IR (entre 0,23 y 2,95 mg/mL), además los valores descritos para Hp en animales sanos, están incluidos en este rango de medida (Cerón 2005, Eckersall 1999). Los niveles séricos descritos para esta proteína en animales que presentan una respuesta inflamatoria son muy variables. Según los datos aportados por diferentes autores, el rango de valores de Hp en las diferentes patologías estudiadas está comprendido desde 0,8 hasta 28 mg/mL (Sheahan et al., 2010; Chase et al., 2012). Aunque la mayoría de estos valores están dentro del rango del ensayo desarrollado, ocasionalmente se han encontrado valores muy elevados de Hp, alcanzando 28 mg/mL (Crawford et al., 2013). Este valor está muy por encima del límite superior de medida establecido para la Hp en las muestras de suero, pero una pre-dilución del suero permitiría la correcta cuantificación. Los valores de Hp determinados a lo largo de esta tesis oscilan desde valores por debajo del límite de detección hasta 13 mg/mL. Sin embargo hay que destacar que la falta de normalización de los diferentes ensayos para la determinación de Hp canina existentes impide una comparación directa de

los diferentes valores de concentración recogidos en la literatura, así como con los valores de concentración de Hp determinados mediante el ELISA desarrollado.

A diferencia de la ITIH4 canina, si existen diferentes métodos validados en la literatura para la cuantificación de la Hp canina, aunque ningún ELISA. El método de cuantificación más utilizado para la Hp, es el ensayo colorimétrico comercializado por Tridelta. Se trata de un método espectrofotométrico basado en la medida de la actividad peroxidasa de los complejos Hp-Hgb a pH ácido, a partir del método desarrollado por Eckersall et al. (1999). Al no ser un inmunoensayo no requiere la presencia de anticuerpos específicos y por tanto se considera un método multiespecie, sin embargo, requiere de una adecuada validación para cada especie. El rango analítico de este método va desde 0 a 2 mg/mL, por lo que no es necesario diluir la muestra tanto como en el ELISA. La imprecisión intra ensayo es mejor que la que presenta el ELISA desarrollado ($< 1,36\%$), aunque los coeficientes de variación inter ensayo son similares (6,9-11% para método colorimétrico). Su principal inconveniente es la fuerte interferencia con hemoglobina, por lo que no es adecuado para cuantificar muestras que presentan hemólisis (Martinez-Subiela et al., 2005).

Recientemente se ha descrito la aplicación y validación en perro de un método inmunoturbidimétrico diseñado para Hp humana (Tecles et al., 2007). Este ensayo presenta buenos resultados con una imprecisión inferior a 5 % y una alta sensibilidad (LoD = 0,012 mg/mL). Se utiliza como calibrador un suero de perro, pero asignándole el correspondiente valor a partir del calibrador del método de tridelta. Y además presenta interferencia en las muestras hemolizadas, infravalorando los valores de Hp.

No se han encontrado en la literatura datos de la validación de ningún ELISA para la Hp canina, solo se dispone de los datos aportados por las casas comerciales para la comparación de la idoneidad del ELISA desarrollado en esta tesis, respecto a los previamente comercializados.

Este ELISA ha sido diseñado para determinar Hp canina en un rango analítico de 4 a 130 ng/mL. Este rango es comparable con el de los kit ELISAS que se encuentran comercializados específicamente para Hp canina; 7,81 – 125 ng/mL ALPCO, 1,95 – 125 ng/mL Innovative Research y GenWay, 1,5 – 100 ng/mL LSBioSciences, 20 – 313 ng/mL Novus.

El porcentaje de recuperación dado para los ELISAS comercializados está en torno al 97 % (Novus), en el caso del ELISA desarrollado supone una mejora respecto de esto ya que el porcentaje de recuperación medio supera el 99 % estando comprendido entre 96,6 – 102 %. Estos valores son comparables con el ELISA GenWay.

Presenta una sensibilidad analítica (LoD = 0,9 ng/mL) mejorada respecto de los datos aportados por la casa comercial para el kit ELISA comercializado por APLCO (5 ng/mL) y en el mismo rango que el de GenWay (0,686 ng/mL) y Novus (0,2 ng/mL).

La imprecisión determinada en términos de porcentaje de coeficiente de variación intra e inter ensayo, sitúa al ELISA desarrollado en una buena posición, con unos coeficientes intra ensayo menores del 5 % para los sueros estudiados, lo que supone una mejora respecto del CV menor del 8 % citado por LSBioSciences, Y unos coeficientes inter ensayo menores del 11 %, como también se declara para el ELISA comercializado por Novus.

Ensayo turbidimético adaptado en placa para cuantificar CRP canina

Los antisueros anti CRP canina desarrollados en esta tesis fueron utilizados para el desarrollo de un método inmunoturbidimétrico para la cuantificación de la CRP canina. Inicialmente los ensayos inmunoturbidimétricos desarrollados para medicina humana, se han utilizado para la determinación de CRP canina, debido a la existencia de reactividad cruzada entre ambas especies, sin embargo este uso presenta algunas limitaciones. El uso de calibradores humanos no permite una

extrapolación directa de los valores de CRP, problema que podría resolverse con el uso de CRP de perro purificada. Además el uso de anticuerpos anti CRP humano, requiere la validación de cada lote de anticuerpo, debido a que la reactividad con la proteína homóloga puede variar, lo que puede afectar a la precisión del ensayo. En los últimos años se han desarrollado nuevos inmunoensayos a partir de anticuerpos específicos de especie. La validación del método desarrollado por nuestro grupo demostró que se había desarrollado un método robusto y preciso que puede adaptarse fácilmente a diferentes analizadores clínicos, lo que proporciona una herramienta útil para la determinación de esta proteína en la clínica veterinaria (Piñeiro et al., 2018).

Debido a que no todos los laboratorios disponen de un analizador automático, se realizó una validación del método desarrollado adaptado a placa microtiter, utilizando los mismos calibradores y las mismas condiciones. El rango de trabajo para ambos ensayos fue el mismo, siendo el LoQ más elevado para el método adaptado a placa, respecto a la validación con el analizador Olympus AU400 (3,3 mg/L de CRP para placa y 1,4 mg/L para Olympus). No obstante el valor de 3,3 mg/L es inferior al LoQ de otros inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos de especie como Gentian o Life Assay (7 mg/L). Sin embargo hay que tomar estas comparaciones con cautela debido a la falta de armonización entre los diferentes ensayos comercializados. La imprecisión del método utilizando el analizador Olympus AU400 fue menor que la obtenida para la adaptación en placa, esto puede ser debido a que con el uso de un analizador automático se elimina el error humano, no obstante los máximos CV intra e inter ensayo obtenidos fueron 5,6 % y 5,4 %, respectivamente.

5.3 Respuesta de ITIH4 durante la fase aguda

Como es bien sabido la respuesta de las PFAs presenta diferencias entre especies. Uno de los objetivos de esta tesis ha sido determinar si, al igual que

sucede en otras especies estudiadas, la ITIH4 se comporta como proteína de fase aguda en el perro.

A lo largo de esta tesis se han caracterizado los valores de concentración de ITIH4 en diferentes modelos experimentales, lo que nos ha permitido evaluar su comportamiento como proteína de fase aguda en la especie canina. En primer lugar, se ha determinado su concentración en muestras de suero obtenidas de animales sometidos a dos tipos de cirugía mayor: OVH y mastectomía. Se eligieron como modelo inflamatorio debido a la intensidad de la respuesta de fase aguda que se ha visto en otros modelos experimentales con animales sometidos a cirugía mayor (Conner et al., 1988; Garcia-Gil et al., 2010; Kjelgaard-Hansen et al., 2013). Posteriormente pudieron evaluarse los valores de esta proteína en perras afectadas por piometra, una de las enfermedades más importantes que afectan a perras en edad fértil y que genera una importante reacción inflamatoria (Dabrowski et al., 2007). Finalmente, pudo evaluarse la cinética de la ITIH4 en sueros de perro infectados experimentalmente con *L. infantum*. Para realizar un estudio comparativo y como control de la presencia de una respuesta de PFAs, a su vez se han medido en las mismas muestras, y con los métodos desarrollados en esta tesis, CRP (principal proteína de fase aguda en perro), Hp y/o GPA (descritas como PFAs moderadas). Los resultados obtenidos permiten concluir que la ITIH4 es una proteína de fase aguda moderada en la especie canina.

La determinación de ITIH4 en animales sometidos a cirugía permitió determinar por primera vez que esta proteína se comporta como proteína de fase aguda positiva en la especie canina. En este estudio se analizaron muestras del mismo animal obtenidas inmediatamente antes (control) y 24 horas tras la cirugía, en dos tipos de cirugía: ovariectomía (OVH) y mastectomía (Mast). En ambos casos se observó un aumento medio en la concentración de ITIH4 de 4 veces el valor previo a la cirugía.

Los valores de concentración de CRP obtenidos antes de ambas cirugías entran dentro del rango de valores previamente descritos en animales sanos (Ceron et al., 2005), menos de 10 mg/L (Figura 26) y también dentro del rango de

valores aportados en esta tesis (apartado 4.4). Los animales que fueron sometidos a OVH eran animales clínicamente sanos sometidos a esterilización quirúrgica. Aunque los perros sometidos a mastectomía, eran animales que presentaban tumores, la presencia de estos no resultó en un aumento de los niveles de CRP y estos se mantuvieron similares a los del grupo control sometido a OVH (animales sanos, valores obtenidos inmediatamente antes de la cirugía). Nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos en perras con neoplasias mamarias, que han mostrado que solamente se encuentran incrementos significativos de CRP en animales con metástasis o con un tamaño de tumor superior a 5 cm y con ulceración (Planellas et al., 2009; Tecles et al., 2009). En el presente trabajo, el resultado anatomopatológico de los tumores analizados tras la mastectomía reveló que el tamaño de estos no era superior a dos cm y en ningún caso se encontró invasión en los vasos linfáticos ni metástasis en los nódulos. Tampoco se observaron diferencias en los niveles de Hp o GPA pre cirugía entre el grupo OVH y Mast. A diferencia de nuestro estudio Planellas et al., (2009), encontraron diferencias significativas entre perros con tumores y animales control para los niveles de Hp, aunque el rango de valores en ambos grupos se solapaba considerablemente. Como también muestran nuestros resultados, no se han encontrado diferencias significativas en los valores de GPA para animales sanos y animales con tumores mamarios en otros estudios (Yuki et al., 2011), excepto en adenocarcinomas mamarios, pero como ocurre con la Hp, los valores encontrados en este tipo de tumores mamarios se solapan con los controles. Además en nuestro estudio el único animal que presentaba adenocarcinoma complejo, mostró un valor de GPA similar al valor medio obtenido tanto para el grupo control OVH y grupo control Mast (valor individual de GPA para animal con adenocarcinoma complejo 0,250 mg/mL). Como sucede para CRP, Hp y GPA, los valores de ITIH4 en los dos grupos controles de ambas cirugías no mostraron diferencias significativas.

Como corresponde a una proteína de fase aguda principal, la concentración de CRP muestra un aumento destacado en las muestras de suero obtenidas 24 horas después de OVH o mastectomía (Figura 26), confirmando que ambas

cirugías desencadenan una respuesta de fase aguda de gran magnitud. En los animales sometidos a OVH la CRP alcanza niveles de concentración de $109,1 \pm 58,7$ mg/L, 24 horas tras la cirugía. Estos valores son similares a los encontrados en un estudio anterior en el que se evaluó la respuesta de las PFAs en perras sanas sometidas a OVH (Dabrowski et al., 2007), donde el valor medio (media \pm SD) de CRP a las 24 horas tras OVH fue de $103,8 \pm 65,2$ mg/L CRP. El incremento observado en nuestro estudio tras la mastectomía fue incluso mayor: $189,6 \pm 102,6$ mg/L (media \pm SD, que representa un aumento medio de al menos 32 veces respecto a los valores pre cirugía). Ambos son incrementos muy elevados, sin embargo en otros estudios ha llegado a mostrar aumentos de CRP de hasta 95 veces el valor inicial tras un proceso quirúrgico (Conner et al., 1988). En el presente estudio, el incremento exacto no se pudo determinar debido a que algunos de los valores de CRP obtenidos antes de las cirugías fueron inferiores al LoQ establecido para el método que se utilizó, la IR, en este caso dichos valores fueron igualados al LoQ (6 mg/L). La magnitud del incremento de CRP no es igual en los diferentes procesos inflamatorios que se han monitorizado en esta tesis, tal y como se mostrará más adelante, esto es debido a que la magnitud de la respuesta inflamatoria por parte de las PFA y en concreto de la CRP tras cirugía se considera que puede estar relacionada con el grado de trauma que la desencadena (Kjelgaard-Hansen et al., 2013).

En el caso de la ITIH4 la concentración aumentó de forma similar en ambas cirugías (incrementos de 4 veces los valores iniciales), por lo que la ITIH4 actúa como PFA en el perro. El aumento de la Hp, que se considera una proteína de fase aguda moderada en esta especie (Ceron et al., 2005), fue inferior (3 veces los valores iniciales para Mast, y 1,8 veces para OVH). Los resultados obtenidos 24 h tras OVH están de acuerdo con los mostrados por Dabrowski et al., (2007), donde los valores de Hp en perras sanas tras esta cirugía mostraban niveles elevados al tercer y quinto día tras la cirugía, con unos incrementos respecto del tiempo inicial de 2 y 2,6 veces, respectivamente. La respuesta de GPA a las 24 horas tras la mastectomía es comparable a la que presentó la ITIH4, en cambio en el caso de la OVH el aumento de la GPA fue menor, 1,5 veces. Los resultados

obtenidos en este estudio para la GPA, muestran diferencias respecto a un estudio previo donde los valores de esta proteína no presentaron aumentos significativos tras la OVH a lo largo del tiempo (Hayashi et al., 2001).

De acuerdo con estos resultados la ITIH4 podría considerarse una proteína de fase aguda moderada en la especie canina. Este modelo experimental, aunque muy interesante porque permitió obtener muestras del mismo animal como control previo a la inducción de la inflamación, tiene sin embargo la limitación de que no se pudo disponer de muestras a un tiempo mayor tras la cirugía. Para poder determinar de forma conclusiva si la ITIH4 es una proteína de fase aguda moderada, o por el contrario, puede presentar aumentos superiores a 10 veces y considerarse una proteína de fase aguda principal, sería necesario determinar la evolución de la concentración a mayor tiempo, para determinar el pico de máxima inducción. Especialmente teniendo en cuenta que el aumento mostrado a las 24 horas es superior al observado para la Hp o GPA, en este y otros estudios mencionados con anterioridad.

El corto periodo de tiempo estudiado también podría explicar la ausencia de diferencias entre OVH y mastectomía en los niveles de ITIH4 y Hp, contrariamente a lo que ocurre con los niveles de CRP canina. Esto puede ser debido a la cinética más rápida que, como proteína de fase aguda principal presenta la CRP, en comparación con las PFAs moderadas, que suelen presentar el valor máximo a partir de las 48 horas.

Debido a que en el estudio de las cirugías solo se pudo disponer de muestras posteriores a las 24 horas post cirugía, no ha sido posible concluir si el máximo aumento de ITIH4 se produce después de este tiempo y podría ser superior. Para tratar de determinar los valores de concentración que ITIH4 puede alcanzar durante la respuesta de fase aguda se evaluaron otros modelos (ver apartados siguientes). Las muestras de animales afectados por piometra, no consistieron en muestras de infección experimental sino que eran muestras de pacientes, por lo que reflejarían diferentes momentos de la enfermedad, correspondiendo a diferentes tiempos respecto el inicio de la infección, por lo que

podríamos encontrar un mayor rango de valores de ITIH4. Los valores de CRP obtenidos en este estudio indican que en estos pacientes se induce una respuesta inflamatoria muy fuerte, incluso para algunos animales, mayor que la determinada en los procesos de cirugía. Tal y como se discutirá más adelante, en este estudio (perras afectadas por piometra) se han encontrado los máximos valores de ITIH4 determinados a lo largo de la tesis. El valor promedio de esta proteína en estos animales ha sido de $1,02 \pm 0,38$ mg/mL. Sin embargo, el incremento de este valor respecto del grupo control fue comparable a los que muestra esta proteína tras cirugía, mientras que el aumento experimentado por la Hp en las mismas muestras fue superior (7 veces respecto el grupo control). No obstante esta parte del estudio tiene la limitación de que los controles no son del mismo animal, como en el caso de cirugía.

Finalmente, la cinética de la ITIH4 ha podido evaluarse en los animales infectados con *L. infantum* ya que fueron monitorizados desde las primeras horas post infección, concretamente a las 24, 48 horas y 1 semana tras la infección. Tras la infección experimental con *L. infantum*, la ITIH4 muestra una cinética más lenta que la CRP, y unos incrementos moderados produciendo una respuesta inflamatoria característica de una proteína de fase aguda moderada (Figura 30). Tras la inyección el pico máximo de ITIH4 observado a las 48 horas aumenta dos veces respecto del tiempo inicial, en cambio el aumento observado en la CRP a las 24 horas es superior a 13 veces respecto del inicial. La evolución temporal de esta proteína, similar a la de la Hp comparada con la evolución que presentó la Hp en las mismas muestras, evidenció su carácter como PFA moderada.

La ITIH4 se comporta como PFA en todas las especies estudiadas hasta el momento, sin embargo la magnitud del cambio experimentado difiere de unas a otras. En cerdos ITIH4/Pig-MAP se considera proteína de fase aguda principal. En diferentes estudios se ha visto que esta proteína aumenta puede aumentar más de 10 veces respecto de sus valores iniciales tras diferentes procesos de fase aguda, como la inflamación inducida mediante la inyección por aceite de trementina o infecciones bacteriana (Gonzalez-Ramon et al., 1995; Heegaard et al., 1998). Pig-MAP generalmente alcanza los valores máximos a los 2 – 4 días

después del estímulo que desencadena la respuesta de fase aguda. Un patrón similar ha sido observado para la ITIH4 bovina en animales tras infección experimental bacteriana en la que los animales desarrollaron mastitis (Piñeiro et al., 2004), la concentración de ITIH4 en suero aumentó de 3 a 4 veces en el suero de vacas con una mastitis clínica moderada y de 6 a 12 veces en vacas con una mastitis clínica severa, alcanzando el pico máximo a las 72 horas tras la infección bacteriana. En cambio estos aumentos, respecto de un grupo control, fueron menores en animales infectados de manera natural y afectados por mastitis subclínica, tanto en suero como en leche (1,5 y 2,5 veces, respectivamente) (Soler et al., 2018). En humanos solo se observó un aumento moderado de ITIH4, de 1,4 a 3 veces, en pacientes tras diferentes procesos de fase aguda como infarto de miocardio, angina de pecho o cirugía programada (Piñeiro et al., 1999). ITIH4 también es una PFA en rata y ratón, aunque en estas especies no se dispone de datos cuantitativos sobre la magnitud del cambio en su concentración sérica (Gonzalez-Ramon et al., 1995; Daveau et al., 1998; Duan et al., 2005).

5.4 Niveles de PFA en perras afectadas por piometra

La piometra es la principal enfermedad que afecta a perras en estado fértil. El diagnóstico y la detección de animales afectados por piometra es importante y decisivo en los casos de piometra cerrada, ya que debido a la ausencia de descargas purulentas su diagnóstico no es evidente. Además este tipo de afección es extremadamente grave, mucho más que la manifestación como piometra abierta, debido a que la acumulación de pus en el útero producido por la propia infección bacteriana puede suponer un alto riesgo de intoxicación generando una inflamación sistémica que puede llevar a la muerte del animal. (Hagman 2018). Como se ha comentado en la introducción, el diagnóstico de esta afección se basa en un diagnóstico diferencial en el que se incluye la historia clínica del animal y un examen físico-clínico y ginecológico. La determinación de variables inflamatorias y su seguimiento puede ser útil para la detección temprana de complicaciones y la detección del progreso de la inflamación sistémica. En

estudios previos se ha visto que esta afección tiene un componente inflamatorio asociado con cambios en la concentración de PFA como CRP, HP y SAA entre otras (Dabrowski et al., 2013; Jitpean et al., 2014c).

Para evaluar los valores de ITIH4 en esta patología, en el presente estudio se incluyeron 11 animales diagnosticados como casos de piometra cerrada. Los casos estudiados fueron seleccionados en base al historial médico, examen clínico junto con el recuento de glóbulos blancos y neutrófilos, vaginoscopia, presencia de útero agrandado y presencia o no de quistes en ovarios y endometrio. Finalmente la confirmación del diagnóstico se realizó mediante el análisis histopatológico. Los animales seleccionados presentaban una respuesta inflamatoria clara, como presentaron los valores del recuento de glóbulos blancos (Tabla 13). Además en la mayoría de los casos, el examen clínico reveló signos frecuentes de la enfermedad como polidipsia, poliuria, falta de apetito, deshidratación, apatía, vómitos y color anormal de las membranas mucosas. El grupo control, formado por 14 perras clínicamente sanas admitidas para esterilización quirúrgica de elección (ovariohisterectomía), no mostró síntomas de inflamación.

El valor medio de CRP encontrado en perras afectadas por piometra fue elevado $147,5 \pm 91,3$ mg/L (media \pm SD), comparable al obtenido tras las cirugías en esta tesis. Además, en este modelo es donde se han encontrado los mayores valores de concentración de ITIH4 y Hp determinados en esta tesis. Los niveles séricos de ITIH4 en los animales afectados por piometra son significativamente más elevados que en el grupo control ($p < 0,001$), aunque el incremento medio fue menor que el experimentado por la Hp (7 veces) y especialmente por la CRP, (26 veces, como corresponde a una PFA principal en perro). A pesar de que en términos de incrementos el aumento de ITIH4 es menor que el experimentado por CRP y Hp, la correlación que presentan los valores de ITIH4 con los valores de CRP y de Hp es elevada, con un valor de rho de 0,81 y 0,79 respectivamente.

Únicamente un animal afectado por piometra presentó un valor de ITIH4 que se solapaba con el rango de valores encontrado para el grupo control del

presente estudio. En el caso de CRP y Hp, ningún animal del grupo piometra mostró valores de concentración por debajo del máximo valor encontrado para el grupo control, siendo 11 mg/L para CRP y 1,4 mg/mL para Hp. Si consideramos los rangos determinados para estas proteínas en animales sanos (apartado 4.4), únicamente el total de los valores de CRP determinados en el grupo de animales afectados por piometra se encuentran por encima de este valor. En el caso de Hp e ITIH4, algunos de los animales afectados por piometra mostraron valores muy próximos o incluidos dentro de los valores de referencia (2,3 y 2,5 mg/mL de Hp y valores por debajo de 0,47 mg/mL para ITIH4). Por tanto la CRP, sería el marcador de elección a la hora de evaluar la inflamación en pacientes afectados por piometra, si lo comparamos con ITIH4 o Hp.

Estudios previos han demostrado la utilidad de las PFA para monitorizar el periodo post cirugía y detectar de forma rápida la aparición de complicaciones (Dabrowski et al., 2007; Dabrowski et al., 2009). En los animales que evolucionan correctamente los valores de las PFA disminuyen de forma progresiva, pero en los animales con complicaciones los valores de CRP y SAA aumentaron a los 4 días tras la cirugía y los de Hp se mantuvieron elevados. Cabe destacar que, hasta el momento el único tratamiento eficaz en esta enfermedad consiste en la práctica de ovariectomía (Hagman 2018).

Por otra parte otros autores han puesto de manifiesto su utilidad en el pronóstico de la enfermedad. Se ha demostrado que las concentraciones de CRP, SAA y Hp difieren de acuerdo al tipo y la severidad de piometra, siendo los valores de estas mayores en animales afectados por piometra cerrada que los que presentaban los casos de piometra abierta (Dabrowski et al., 2013), coincidiendo con una mayor la severidad de los signos clínicos. Además se han visto diferencias en los valores de CRP entre perras con piometra y perras con hiperplasia endometrial quística (HEQ) (Enginler et al., 2014), siendo mayores los valores de esta proteína en piometra. Esto puede ser útil ya que ambas, HEQ y piometra, son difíciles de distinguir clínicamente debido a que en ambas se produce la acumulación de fluido.

En varios estudios llevados a cabo, se ha puesto de manifiesto que un alto porcentaje de las perras con piometra presentaban síndrome respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) o sepsis (Fransson et al., 2007). Los valores de CRP, se han visto asociados con un aumento de la mortalidad en perros con episodios de SIRS y sepsis (Gebhardt et al., 2009). En animales con sepsis ocasionada por piometra, y con una hospitalización prolongada tras la cirugía también se ha encontrado una asociación con la CRP (Franson et al., 2007). En cambio la asociación de esta proteína con la presencia de sepsis, así como con la incidencia de la enfermedad en largos periodos de hospitalización no ha podido ser confirmada en estudios posteriores, en los que si se encontró una relación entre los valores de SAA y la presencia de sepsis ocasionada por piometra (Jitpean et al., 2014a; Jitpean et al., 2014b). En estos casos la determinación de otras PFAs quizá podría contribuir a un mejor diagnóstico.

5.5 PFAs como biomarcadores en *L. infantum*

Leishmania infantum es el principal causante de la leishmaniosis visceral tanto canina como humana, y la especie canina juega un papel importante como reservorio. Además constituye un serio riesgo de infección, particularmente para pacientes inmunocomprometidos (Badaro et al., 1986). Se ha observado aumento de las concentraciones de PFAs, concretamente de la CRP, en casos de leishmaniosis visceral en humanos, así como su remisión hasta valores normales durante el tratamiento de la enfermedad (Wasunna 1995; Singh 1999), sugiriendo el uso de estas proteínas como marcadores mínimamente invasivos para monitorizar la enfermedad. En perros se ha visto que *Lcan* genera una respuesta inflamatoria caracterizada por variación en las PFA, con aumentos en CRP, ferritina sérica y Hp, en animales infectados tanto de forma natural como experimentalmente (Martinez-Subiela et al., 2002; Sasanelli et al., 2007; Martinez-Subiela et al., 2011a; Martinez-Subiela et al., 2014).

Es importante detectar la infección en animales en estadíos tempranos para poder controlar la transmisión entre perros y de perros a humanos. En diferentes estudios realizados en áreas donde la enfermedad es endémica, se ha

confirmado que la prevalencia de la infección en perros (de un 63 a un 80 %, determinada mediante la detección del parásito por PCR), es mucho mayor que la proporción que realmente desarrolla la enfermedad sintomática, por lo que esta población de animales asintomáticos constituye un reservorio oculto de la enfermedad (Solano-Gallego et al., 2001; Alvar et al., 2004). La confirmación estándar actual para *Leishmania visceral* se realiza a partir de una biopsia de bazo o aspirado de médula ósea, una técnica muy invasiva que no puede repetirse con frecuencia (Kip et al., 2015). Martínez-Subiela et al., (2011a) observaron un aumento en la concentración de las PFAs en animales infectados que todavía no habían desarrollado la enfermedad, lo que ha llevado a pensar que la determinación de las PFA, método mínimamente invasivo aunque no específico, junto con test específicos de *Leishmania*, podría ayudar en la detección temprana de la enfermedad.

En el presente trabajo, en un primer estudio preliminar se determinaron los valores de PFA en sueros de animales infectados experimentalmente con *Leishmania infantum*, un año después de la infección, y en animales no infectados que sirvieron como grupo control. La infección por *L. infantum* resultó en aumentos significativos aunque moderados de los valores de CRP. La concentración en los sueros de los cinco animales infectados fue de $26,3 \pm 21,1$ mg/L de CRP (media \pm SD), al menos 5 veces mayor de la que se encontró en los animales control no infectados. Estos valores son superiores a los encontrados por Sasanielli et al., (2007) ($17,5 \pm 3,0$ mg/L CRP), en animales infectados de manera natural por *L. infantum* y que presentaban sintomatología compatible con la enfermedad, y similares a los encontrados por Martínez-Subiela et al., (2003) ($27,2 \pm 9,3$ mg/mL y $28,5 \pm 10,2$ mg/L de CRP) en el mismo tipo de animales. Sin embargo los valores de CRP determinados en un estudio anterior de los mismos autores (Martínez-Subiela et al., 2002), también en animales infectados de forma natural, fueron más elevados ($65,3 \pm 55,1$ mg/L en animales sintomáticos y $30,8 \pm 37,9$ mg/L en los que no presentaron sintomatología, representando un incremento de respectivamente 30 y 15 veces el valor determinado en los animales control, superior al observado en nuestro estudio). A la hora de

comparar los diferentes estudios, además del tamaño de muestra (en nuestro estudio solo hay 5 animales infectados de los cuales tres presentan sintomatología), es importante tener en cuenta que los valores individuales de CRP pueden no ser comparables con los nuestros, puesto que se utilizan diferentes métodos de medida, y no existe una armonización de los métodos analíticos. Sin embargo nuestros resultados son similares en cuanto a que los animales con sintomatología también presentaron valores de CRP superiores a los asintomáticos (aumento de 2,5 veces respecto del valor de los animales no infectados para los asintomáticos y de 7 veces para los sintomáticos).

La ITIH4 también aumentó en los animales infectados por *Leishmania* respecto a los animales control, este aumento se vio tanto en suero (3 veces la concentración de proteína) como en hígado (4 veces el mRNA). Curiosamente en este caso la diferencia de la ITIH4 con la CRP, en cuanto a la magnitud del aumento en suero frente a los animales control, no es tan grande como en otros modelos estudiados en esta tesis, como la cirugía o la piometra. Además como ocurre con la CRP, los valores encontrados para ITIH4 en animales que no muestran sintomatología clínica (valores desde 0,246 hasta 0,353 mg/mL de ITIH4) no se solapan con los que se encuentran en los animales que si la muestran (valores desde 0,429 hasta 0,851mg/mL de ITIH4). Esto no ocurre con la Hp, donde los valores entre los animales sintomáticos y asintomáticos se solapan (Tabla 15). La Hp presenta además un aumento muy moderado en los animales infectados respecto el control de animales no infectados (1,5 veces). En el estudio anteriormente citado de Martínez-Subiela et al., (2002) los valores de Hp en los animales infectados presentaron un aumento en el valor de concentración respecto de los animales no infectados, mucho mayor que el encontrado en esta tesis (5 veces, tal y como indican los autores), no mostrando diferencias entre animales sintomáticos y asintomáticos. La GPA no parece comportarse como buen indicador para diferenciar animales infectados de los no infectados con *L. infantum*, debido a la ausencia de diferencias en los valores de esta proteína entre ambos grupos (Figura 28). No se han encontrado datos en la literatura referentes a esta proteína en infección por *L. infantum*.

La metodología utilizada por los diferentes autores de los estudios anteriormente citados, para determinar CRP y Hp es diferente a la usada en esta tesis, tal y como se ha comentado anteriormente no es posible una comparación directa de los valores individuales de las proteínas determinadas con los nuestros, aunque la comparativa en términos de incrementos ponen en evidencia las diferencias encontradas, tanto en los valores de CRP como en los de Hp, entre los resultados de los citados estudios y los mostrados dentro de este trabajo. Si bien es cierto que en varios de los estudios indicados (Martinez-Subiela et al., 2002; Martinez-Subiela et al., 2003; Sasanielli et al., 2007) aun utilizando la misma metodología para la cuantificación de CRP, los valores mostrados para los animales infectados con manifestaciones clínicas en los diferentes estudios varían sustancialmente. Una posible explicación para esas diferencias, puede ser debida a que son estudios en los que los animales están infectados de forma natural, y los valores de CRP han sido determinados a diferentes tiempos de la infección. Tal y como ponen de manifiesto Martinez-Subiela et al., (2011b) y esta tesis en el estudio que comentaremos a continuación (apartado 4.3.3.2), los valores de CRP no se mantienen constantes a lo largo de la infección.

De cara a evaluar la evolución de las diferentes PFAs estudiadas en esta tesis, y en particular la ITIH4, se ha realizado un segundo estudio en el que se ha podido monitorizar a lo largo del tiempo la respuesta de CRP, ITIH4 y Hp en animales infectados experimentalmente con *L. infantum*. La toma de muestra se realizó a diferentes tiempos tras la infección: 24 y 48 horas, 1 semana, 2, 3, 4, 6, 8, y 10 meses. De acuerdo con la información de que disponemos, este es el primer estudio en el que se determina la evolución de las PFA en el periodo inmediato post infección con *L. infantum*. En las horas siguientes a la infección pueden verse cambios significativos en los niveles de PFA, que ponen de manifiesto la existencia de una respuesta inflamatoria elevada asociada a la infección. Esta respuesta se caracterizó por un pico máximo de CRP a las 24 horas, que alcanzó un valor promedio de 82 mg/L, para después disminuir de forma progresiva hasta alcanzar los niveles de pre-infección. La evolución temporal de la ITIH4 en los primeros días tras la infección es similar a la que

presenta la Hp. Ambas proteínas presentan cinéticas propias de PFAs moderadas, retrasando la aparición del pico a partir de las 48 horas y manteniéndolo hasta una semana, similar a como se ha visto para Hp en trauma quirúrgico (Conner et al., 1988). Cabe destacar que se ha encontrado una gran variabilidad entre la respuesta individual de cada animal y también entre las diferentes PFA frente a la infección. El aumento experimentado por CRP se asemeja al que se observa tras la infección experimental con *Leptospira interrogans* (Caspi et al., 1987), además en ambos casos se refleja la variabilidad de la respuesta de cada animal.

Es sabido, que tras la picadura del flebótomo se produce una reacción inflamatoria local en la que intervienen las células dendríticas, linfocitos T y B y macrófagos (Teixeira et al., 2006). Los receptores fagocíticos de tipo TLR de estas células inician la respuesta inmunitaria innata tras reconocer los patrones PAMP del parásito. Debido a que los parásitos son también eucariotas, los TLR que reconocen PAMP parasitarios presentan un umbral de activación superior a los que reconocen otros patógenos como bacteria y virus, de manera que el huésped infectado puede soportar altas cargas parasitarias hasta que se activa su respuesta innata. Tras la activación de linfocitos, células dendríticas y macrófagos se produce una cascada de citoquinas que inducen el reclutamiento de nuevos macrófagos y células NK, las cuales inician la respuesta innata para combatir los parásitos en el lugar de la infección (Teixeira et al., 2006). Una fagocitosis rápida es clave para la supervivencia del parásito, debido a que en el interior de los macrófagos *Leishmania* es capaz de sobrevivir y multiplicarse gracias al desarrollo de mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Sacks et al., 2002).

La respuesta inmune que desarrolla el perro es clave en el curso de la infección por *L. infantum*, ya que de ella dependen las manifestaciones clínicas que se pueden observar: infección subclínica, enfermedad moderada o leve, o enfermedad muy grave. Los factores más importantes que hacen que un perro avance hacia el control de la infección o hacia la enfermedad clínica son el sistema inmunitario y la base genética, aunque también pueden influir la edad, el

sexo, el estado nutricional de perro, la virulencia de la cepa y la carga parasitaria en el perro infectado, así como la presencia de infecciones previas o enfermedades concomitantes (Villanueva 2013).

En términos generales la respuesta de las PFA observada en nuestro estudio varía mucho de un animal a otro, y los aumentos máximos no siempre suceden al mismo tiempo para cada animal. En otros estudios, en los que se evaluó la evolución de estas proteínas en animales infectados y sometidos a tratamiento farmacológico para combatir la infección, se observó la misma disparidad en la respuesta individual de las PFA para cada animal, así como la variabilidad en la respuesta entre las diferentes PFAs (Martinez-Subiela et al., 2003; Sasanelli et al., 2007).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron diferencias con un estudio anterior (Martinez-Subiela et al., 2011b), en el que CRP, SAA y Hp fueron monitorizadas de forma mensual tras la infección experimental con *L. infantum*. En el mencionado estudio, los autores afirman que aumentos significativos de CRP, Hp y SAA se anticipan a la aparición de una sintomatología clínica moderada. Según los autores los síntomas clínicos aparecen a los 4 meses en todos los animales, y los aumentos máximos de estas PFA se hacen evidentes a los 2 meses tras la infección. En el estudio que se muestra en esta tesis, la evolución de los valores de CRP, exceptuando el pico anteriormente mencionado debido a la primera fase de la infección, muestra un aumento que se hace significativo a los 8 meses tras la infección. Este pico alcanza un valor medio de 54,78 mg/L y supone un aumento de al menos 9 veces el valor inicial de CRP. Se observa por tanto en nuestro estudio la aparición de un pico más tardío, pero con un mayor incremento que el observado en el estudio de Martinez-Subiela et al., (2011b). En el caso de la Hp, en nuestro estudio vemos la aparición de un aumento significativo a los 3 meses, y un aumento máximo a los 10. Además la aparición de los síntomas no se produce por igual en todos los animales y tampoco con la misma prevalencia. Aunque son animales de la misma edad y raza, la carga parasitaria utilizada por Martinez-Subiela et al., para la infección es 8 veces superior a la usada en el modelo experimental incluido en esta tesis, por

lo que es de esperar que la evolución de la infección y por lo tanto el desarrollo de la enfermedad no sea igual en ambos estudios. Además cabe destacar que puede que la capacidad infectiva de la cepa no sea la misma.

Hasta la fecha, la aplicación clínica de la medida de las PFA en pacientes con *Leishmania*, se ha enfocado principalmente hacia su uso en la monitorización de la evolución frente al tratamiento, que se evidenciaría mediante una disminución de la concentración de PFA positivas y un aumento de la concentración de PFA negativas (Martinez-Subiela et al., 2003; Martinez-Subiela et al., 2016) (Martinez-Subiela et al., 2016). Hecho que también se ha demostrado en humanos con Leishmaniosis visceral (Wasunna et al., 1995).

El grupo del Profesor Cerón de la Universidad de Murcia, en un reciente trabajo recopilatorio, propone una posible clasificación de los pacientes infectados por *Leishmania canina* de acuerdo a la presencia de sintomatología clínica y valores de PFA, en particular CRP y ferritina, que facilitaría el tratamiento y el seguimiento de los animales (Ceron et al., 2018). El primer grupo según estos autores, estaría caracterizado por una ausencia de síntomas clínicos y un rango de CRP y ferritina dentro de los valores normales. Englobaría animales infectados pero resistentes al desarrollo de síntomas clínicos, o que no han desarrollado todavía RFA, o aquellos que han respondido bien al tratamiento. Los animales de este grupo deberían ser monitorizados pero no necesariamente tratados. Un segundo grupo, incluiría los animales que muestran cambios moderados de estas PFAs, pero no sintomatología clínica, pudiendo presentar o no anomalías en el recuento de células blancas, o en el perfil bioquímico. En estos casos un aumento de las PFAs podría indicar riesgo de desarrollo de la enfermedad. Sin embargo hay que tener en cuenta que en algunos casos el aumento podría no ser debido al empeoramiento de la infección por *Leishmania*, sino a otras causas, como otras infecciones, neoplasia o trauma, por lo que los animales en este grupo deberían ser cuidadosamente diagnosticados y tratados contra la verdadera causa que les está generando un aumento de las PFAs. Y por último un tercer grupo incluiría a aquellos animales que muestran síntomas de la enfermedad y

cambios en la concentración de CRP y ferritina. En este grupo la severidad de la enfermedad podría evaluarse en función del aumento de dichas proteínas.

En el trabajo realizado por dichos autores no se contempla la presencia de síntomas clínicos pero la ausencia de aumento de PFA, tal y como ocurre para algunos de los animales que se han evaluado en esta tesis. Sería interesante estudiar si existe alguna relación entre la ausencia de una respuesta de PFAs y la evolución de la enfermedad en estos animales.

En el resultado y la evolución de la infección con *Leishmania*, la respuesta mediada por los linfocitos T CD4 se considera importante. La respuesta celular Th1 mediada por estos linfocitos se ha asociado con la inmunidad protectora, mientras que la respuesta humoral Th2 se ha asociado con el progreso de la enfermedad (Baneth et al., 2008). La leishmaniosis canina frecuentemente está asociada a una respuesta humoral marcada, la cual no es protectora. Los niveles de anticuerpos anti *Leishmania* detectados en animales sintomáticos son mayores que los detectados en animales asintomáticos, estableciendo una asociación entre esos niveles y el estado clínico de la enfermedad (Baneth et al., 2008). Estudios previos han asociado a la Hp un papel en el balance de la respuesta inmunitaria, favoreciendo la activación de una respuesta celular (tipo Th1), frente a la activación humoral (Th2) (Arredouani et al., 2001; Arredouani et al., 2003), por lo que podría haber una relación entre la intensidad de la respuesta de PFA, particularmente de Hp y el desarrollo de la enfermedad. En nuestros datos se podría intuir esa relación ya que los dos animales (animal 6 y 7) que mayor aumento de Hp mostraron a las 48 horas tras la infección (mayor de tres veces) no mostraron títulos elevados a lo largo de todo el periodo monitorizado (Figura 30 y Figura 33).

Por otra parte, en nuestros resultados, se ha encontrado una correlación positiva entre los valores de CRP y las titulaciones de anticuerpos obtenidas por IFI y ELISA (0,52 y 0,54, respectivamente), al igual que en el caso de la ITIH4 (0,56 y 0,58, respectivamente). Sin embargo la Hp mostró una correlación baja (0,36 y 0,34). Recientemente se ha publicado un estudio en el que se relaciona la

concentración de CRP y Hp con el título de anticuerpos frente a *Leishmania* (Cantos-Barreda et al., 2018). En dicho estudio no se encuentran diferencias entre los valores de CRP y Hp al separar animales en positivos o negativos a la infección de acuerdo a los valores de títulos establecidos, sin embargo si se observa una asociación de niveles elevados de PFAs con altos títulos de anticuerpos en suero determinados mediante TR-IFMA para la CRP, pero no para la Hp.

5.6 Niveles de referencia de las PFAs

A partir de las muestras analizadas en este estudio, correspondientes a animales sanos, se han establecido unos rangos de referencia para las PFA estudiadas, que puedan servir como una primera aproximación a los que serían los niveles de basales en condiciones normales. En el caso de ITIH4 serían los primeros valores descritos en la literatura, puesto que esta proteína se cuantifica por vez primera en esta tesis, y en el caso de las restantes PFA nos permitirían disponer de unos valores de referencia asociados a los métodos analíticos desarrollados, dada la disparidad de valores recogidos en la literatura para, por ejemplo la Hp.

El rango de valores de referencia establecido para la CRP fue de 1 a 11 mg/L, este rango de valores estaría incluido en los rangos establecidos para esta proteína por diversos autores (revisado en Ceron et al., 2005). De la misma forma que se ha indicado previamente (Yamamoto et al., 1994), no se han visto diferencias entre los valores de CRP relacionadas con la edad ni con el sexo de los animales, y tampoco entre Beagles y animales de otras razas. Respecto a la variabilidad de la CRP en las diferentes razas, no se han encontrado datos en la literatura. Sin embargo en el caso de la CRP los valores de referencia fisiológicos obtenidos para una población de razas heterogénea indican una variabilidad no relevante respecto al valor discriminante desde el punto de vista diagnóstico (Yamamoto et al., 1994).

Los mismos resultados en cuanto a la ausencia de diferencias divididas al sexo o edad se han observado en nuestro estudio para la Hp, siendo el rango establecido para esta proteína de 0,04 hasta 2,25 mg/mL. De la misma forma que para la CRP, estos valores de Hp entran dentro de los rangos establecidos por otros autores para animales sanos: de 0 a 3 mg/mL por Eckersall et al., (1999), aunque son ligeramente más amplios que los establecidos por otros autores (0,3 a 1,8 mg/mL)(Martinez-Subiela et al., 2004).

La concentración de ITIH4 en los sueros de perro utilizados para establecer de manera preliminar un rango de valores de concentración para animales sanos fue de 0,09 hasta 0,47 mg/mL. Esta concentración de ITIH4, muestra valores similares a los encontrados en terneros sanos (Piñeiro et al., 2004) o en humanos (Piñeiro et al., 1999), pero menor que los valores que los valores normales encontrados para cerdos de diferentes edades (Piñeiro et al., 2007b). A diferencia de la CRP y la Hp, la ITIH4 mostró diferencias significativas entre el grupo de Beagles y el resto de razas, mostrando el primero un rango de valores más bajo (de 0,09 a 0,40 mg/mL de ITIH4). A su vez estos animales presentaron diferencias significativas entre machos y hembras, siendo el valor medio para machos mayor que el encontrado para hembras ($0,25 \pm 0,09$ y $0,16 \pm 0,07$ mg/mL de ITIH4, respectivamente), diferencias similares entre sexo se han visto para la Pig-MAP en cerdos adultos procedentes de granjas comerciales (Piñeiro et al., 2007b). Sin embargo no se han observado diferencias para la ITIH4 canina entre machos y hembras en el grupo de animales que estaba compuesto por varias razas de perros. En este grupo tampoco se vio una relación entre los valores de ITIH4 y la edad del animal. Las diferencias observadas en el grupo de Beagles pueden ser debidas a que es un grupo homogéneo, todos los animales tienen la misma edad (cachorros) y son animales que muestran el mismo origen genético. Sin embargo en el otro grupo, tal y como se ha comentado estaba compuesto por animales pertenecientes a diferentes razas e incluso por animales mestizos de diferentes edades, por lo que es complicado evaluar el efecto de la edad y de la raza.

Las concentraciones de GPA mostraron diferencias significativas entre el grupo de Beagles y el resto de razas, siendo mayor para los primeros, a diferencia

de como ocurría en la ITIH4 y, a diferencia también, de los resultados obtenidos por Yuki et al., (2010) quienes vieron que el valor medio de la GPA en Beagles era significativamente menor que en perros mestizos. En el presente estudio no se han encontrado diferencias en los valores de GPA entre machos y hembras en la población de Beagles, tal y como comentan algunos autores (Kuribayashi et al., 2003; Yuki et al., 2010).

5.7 Niveles de PFA en perros alojados en centros de protección animal. PFAs en la evaluación del bienestar animal

Los centros de protección animal, tanto oficiales como privados, han sufrido una evolución en los últimos años. A ellos llegan animales, fundamentalmente perros, que bien son recogidos por los servicios municipales de la vía pública o son entregados por sus propietarios en los centros por diferentes motivos. En cualquiera de los casos se establece una situación nueva en los animales, en mayor o menor medida afectada por las circunstancias de la llegada al centro (persecuciones prolongadas en el tiempo, traumatismos, etc.) y las propias circunstancias del centro: nº de animales (hacinamiento), características de las instalaciones, características del manejo y procedimientos de trabajo, etc.. Todas estas circunstancias van a provocar una situación de estrés en los perros en mayor o menor medida.

Desde la Asociación Española de veterinarios Municipales se ha promovido la creación, en el seno de AENOR, de un Comité Técnico de Normalización, el 313, con el objetivo de crear una norma de calidad aplicable para los centros de protección animal y residencias de animales de compañía que valore los aspectos relacionados con la sanidad y el bienestar animal. El bienestar, entendiendo como tal la ausencia de enfermedad y de estrés, a día de hoy, en el ámbito de los perros, no deja de ser una valoración subjetiva, que aunque sea realizada por personal cualificado y con amplia experiencia puede tener, en algunos casos, un margen de error importante. Por este motivo, entre

otros, es muy importante poder disponer de algún o algunos parámetros de referencia medibles, y por lo tanto objetivos, para valorar el estado de bienestar de los perros en dichos centros.

La medida del cortisol como indicador del nivel de estrés ha sido estudiada en animales alojados en centros de protección. Se ha visto que los valores de cortisol aumentan cuando los animales se introducen en el chenil (Rooney et al., 2007), sin embargo este metabolito parece estar relacionado con el estrés agudo y no con el estrés de tipo crónico, ya que no se ha visto una relación de los niveles de cortisol y condición de bienestar en animales alojados durante largo tiempo, más de dos años, en los centros de protección (Cafazzo et al., 2014).

La medida de las PFA ha resultado un parámetro útil en la evaluación del bienestar animal, particularmente en animales de granja. En la especie porcina, varios estudios han mostrado que el estrés asociado al transporte resulta en un aumento de las PFA (Saco et al., 2003; Pineiro et al., 2007), y el aumento está relacionado con el estrés causado durante el transporte, siendo menor si los animales se transportan en condiciones óptimas (Pineiro et al., 2007). Los niveles de PFAs no solo se ven afectados tras el transporte sino también como consecuencia de la adaptación a un nuevo ambiente y la manipulación del animal (Salamano et al., 2008), así como en el hacinamiento de los animales (Marco-Ramell et al., 2011).

Para evaluar el valor de las PFA como marcadores de bienestar animal en la especie canina, en el presente estudio se ha determinado la concentración de tres PFAs canina (CRP, ITIH4 y Hp) en perros alojados en centros de protección animal. Se ha evaluado la evolución de cada una de estas proteínas en los animales desde el momento de la llegada del animal al centro, a los 2-3 días de permanencia en el centro, a los 15 días y un mes después de permanecer en el centro. De esta manera se ha podido evaluar si los niveles de PFA se elevan como consecuencia del internamiento del animal en el centro (marcador de estrés) y la evolución de los niveles de estas proteínas tras la entrada en el centro.

Un número importante de los animales que llegaron a los centros de protección (el 33 % del total) presentaron valores de CRP por encima de la normalidad, algunos de ellos muy elevados llegando a superar los 80 mg/L de CRP. Por ello los animales se englobaron en dos grupos: los que presentaban una concentración dentro del rango de referencia y los que presentaban una concentración por encima del rango de referencia.

Los valores de CRP mostraron una evolución a lo largo de la permanencia del animal en el centro. De manera general se ha visto que los animales que llegaron a los centros con valores de CRP dentro de la normalidad, aumentaban su concentración, mientras que los que llegaron con valores elevados, disminuían hasta igualarse con los anteriores a partir de 15 días de permanencia en el centro. Analizando los valores de CRP del conjunto de todos los animales estudiados (Figura 42) puede verse que la permanencia en el centro se asocia con valores de CRP por encima de 11 mg/L, es decir, por encima del valor de referencia asignado para esta proteína. Sin embargo, como se discutirá más adelante, existen diferencias en los niveles de CRP entre los centros estudiados, que podrían asociarse a las condiciones de alojamiento del mismo, que se traduce en un mayor o menor grado de bienestar del animal. A la vista de los resultados la ITIH4 no parece ser tan buen indicador como la CRP para la monitorización de los perros en los centros de protección, puesto que las variaciones observadas son menores. Como corresponde a una PFA moderada la ITIH4, al igual que la Hp, presenta una cinética más lenta, y mantiene durante un periodo mayor los niveles elevados. Sin embargo en el caso de la Hp el aumento observado tras el ingreso en el centro de protección es mayor, y ya significativo a los 2-3 días de la llegada del animal al centro (animales con valores iniciales dentro de la normalidad).

Un análisis del valor medio de estas proteínas en cada uno de los centros, determinado a partir de los 15 días del ingreso del animal, muestra diferencias entre centros, asociándose el valor más alto de CRP (26 mg/L) y Hp (2,8 mg/mL) al centro en el que los animales no comparten el chenil, no poseen comida dentro del chenil, no pasean debido a la ausencia de voluntarios del centro, tampoco

tienen zona de ejercicio común y están sometidos a estímulos auditivos fuertes, próximos y permanentes. Mientras que el centro donde los animales pasean, poseen comida dentro del chenil y no están sometidos a estímulos auditivos presentan los valores de CRP más bajos y dentro del intervalo de referencia. Los valores de Hp por debajo de los valores de referencia (menor de 2,3 mg/mL) se asocian con los dos centros donde los animales pasean y tienen comida en el chenil. Nuestros estudios coinciden con un estudio previo (Cafazzo et al., 2014) en el que se determinó que el poder salir del chenil a pasear era determinante para el nivel de bienestar, de los perros alojados en centros de protección, traducido en un mayor nivel de antioxidantes y menor número de comportamientos estereotípicos. Este beneficio en el bienestar animal, asociado a si los animales pasean o no, aunque ya se observa en el primero de nuestros estudios (evolución de los niveles de PFA tras el ingreso en el centro de protección), se confirma aun con más claridad en los resultados del segundo estudio de esta tesis, en el que se han podido incluir muestras de más centros de protección. En este estudio más amplio se dispuso únicamente de una muestra por animal, tomada o bien en el momento de la llegada, o en animales que llevaban el centro un periodo superior a 15 días. Los valores medios de CRP de cada uno de los centros, muestran diferencias entre unos y otros, asociadas principalmente a si los animales salen a pasear o no. El análisis del total de las muestras de animales alojados en los centros de protección reveló diferencias significativas, mostrando los valores de CRP más bajos aquellos animales que pasean diariamente, seguidos de los que presentan una rutina de paseo semanal y siendo los más elevados los de aquellos animales que no pasean.

Nuestros resultados muestran que la medida combinada de CRP y Hp podría permitir clasificar los centros en función de sus características y poder establecer un orden en función de si estas generan mayor estrés en los animales. En el centro 3 donde las características del centro generarían un ambiente más favorable a unas condiciones de bienestar (paseos, ausencia de ruidos, chenil compartido, comida en el chenil...) presenta unos valores medios de CRP y Hp por debajo de los valores de referencia establecidos para ambas proteínas. En los

otros dos centros la modificación de estos parámetros, se ven traducidos en un aumento en las concentraciones medias de CRP y/o Hp. En el estudio de Cafazo et al (2014), factores como el tamaño del chenil y si los animales están solos o lo comparten también se han estudiado, no pareciendo afectar en el estrés.

Por otra parte la medida de la CRP en las muestras de sangre tomadas a la llegada del animal al centro de protección, ha permitido establecer diferencias entre los animales que son entregados en los centros, frente a los que son recogidos, siendo los valores de los primeros más bajos. Esto podría asociarse al estado de los animales ante una nueva situación. Los perros pueden sentir miedo ante nuevas experiencias, para minimizar este efecto se ha propuesto una introducción gradual de los animales ante una situaciones potencialmente estresantes de manera que se minimice el nivel de ansiedad que puedan presentar (Rooney et al., 2009). De esta manera un animal que es entregado en el centro de protección por el dueño presentaría normalmente un nivel de estrés menor que aquel que ha sido recogido por una persona desconocida, generando una situación de alerta para el animal. El grupo de animales recogidos incluye animales que han sido abandonados por el dueño y han sufrido situaciones más traumáticas, hambre, persecuciones, etc... Un buen número de estos animales (el 41 %) presentaban sintomatología clínica, o lesiones, sin embargo las diferencias se mantienen en aquellos animales sin sintomatología, lo que indica que los niveles de CRP pueden aumentar igualmente de forma significativa como consecuencia del estrés sufrido por el animal aun en animales aparentemente sanos. No existe apenas ningún estudio en la literatura que evalúe las PFA como marcadores de estrés en la especie canina (Casella et al., 2013; Fazio et al., 2015), por lo que nuestros resultados tienen gran relevancia, al ser los primeros que relacionan los niveles de PFA con el estado de bienestar del animal.

El análisis de los valores de CRP en los animales acogidos en centros de protección, ha permitido, al mismo tiempo se ha podido establecer una relación entre el estado nutricional de los animales y los valores de CRP, siendo esta más elevada en los animales delgados. Esta elevación podría estar asociada a la presencia de procesos patológicos que causen pérdida de peso, sin embargo las

diferencias significativas se mantienen cuando se analizan los animales clasificados como sin sintomatología clínica. Algunos autores (Veiga et al., 2008) han encontrado una asociación de valores bajos de CRP en perros que presentaban obesidad y resistencia a la insulina, mientras que otros autores (Tvarijonaviciute et al., 2011) no han encontrado cambios significativos en los valores de las PFAs asociados al sobrepeso inducido en condiciones experimentales. En nuestro caso, aunque hay que tener en cuenta que el número de animales es bajo, no se encontraron diferencias entre los valores de CRP entre animales obesos y normales.

A diferencia de los resultados en relación con el estado nutricional, los valores de CRP no se han podido asociar con diferencias en el comportamiento en animales clínicamente sanos, aunque si se han observado valores de CRP más elevados en animales clasificados como nerviosos al evaluar el total de la población que incluiría animales con sintomatología clínica.

6 CONCLUSIONES

Conclusiones

Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente estudio se deducen las siguientes conclusiones principales:

1. Por primera vez se ha aislado y caracterizado la proteína ITIH4 en la especie canina. Al igual que en otras especies la ITIH4 canina consta de una única cadena polipeptídica de 120 KDa.

2. La obtención de anticuerpos específicos anti ITIH4 caninos, mediante inmunización de conejos, ha permitido el desarrollo y validación de dos métodos para la cuantificación de esta proteína en muestras de suero de perro: Inmunodifusión radial y ELISA.

3. La purificación de CRP, Hp y GPA, y la su posterior inmunización de conejos con las proteínas aisladas, ha permitido la obtención de antiseros específicos frente a estas proteínas, y el consiguiente desarrollo y validación de tres métodos de inmunodifusión radial, para la cuantificación de dichas proteínas en suero de perro, así como un ELISA tipo sándwich para la cuantificación de Hp en suero de perro.

4. La determinación de la concentración de ITIH4 en muestras de suero de animales sometidos estímulos inflamatorios de diferente origen (cirugía mayor, piometra, infección por *Leishmania*) ha permitido caracterizar a esta proteína como proteína de fase aguda moderada en la especie canina. La concentración de ITIH4 aumentó más de 3,5 veces respecto del control a las 24 horas de la cirugía mayor, y en animales afectados por piometra. La cinética de esta proteína se ha podido evaluar en animales infectados experimentalmente por *Leishmania infantum*, alcanzado un pico a las 48 horas tras la infección.

5. Se ha evaluado durante un año la evolución de la concentración de ITIH4, CRP y Hp en animales infectados de forma experimental con *L. infantum*. Por primera vez se ha descrito la existencia de una fuerte respuesta de PFA en el periodo inmediato tras la infección del animal, con valores máximos a las 24-48 h dependiendo de la PFA. Los valores de las PFAs volvieron a aumentar de forma más moderada entre los 8-10 meses post infección, coincidiendo en términos

Conclusiones

generales con la aparición de signos clínicos. Para las tres proteínas estudiadas, se observaron diferencias en la evolución individual de cada animal, no presentando picos máximos de concentración a los mismos tiempos y siendo los aumentos observados muy variables.

6. CRP e ITIH4 mostraron una correlación positiva y moderada ($R > 0,5$) con la cantidad de anticuerpos anti *Leishmania* que presentaba el animal y también con la sintomatología clínica. La relación de Hp fue débil ($R < 0,4$)

7. La cuantificación de ITIH4, CRP, Hp y GPA, en sueros de perros clínicamente sanos ha permitido establecer un intervalo de referencia para cada una de estas proteínas, para los métodos analíticos desarrollados en este trabajo.

8. Se ha determinado la evolución de la concentración de ITIH4, Hp y CRP en animales alojados en centros de protección. Para aquellos animales que presentaban valores de PFA en el rango de normalidad a la llegada al centro la concentración de las PFA se elevó tras el ingreso, pero el aumento observado depende de las características del centro. La cuantificación de CRP y Hp en animales alojados en centros de protección ha permitido encontrar una relación entre dichas proteínas y las características de los diferentes centros estudiados.

9. La concentración de CRP en los animales que llegan a los centros de protección, fue menor para los animales entregados que para los recogidos. Además los animales alojados en dichos centros presentaron un menor nivel de esta proteína si el centro disponía de voluntarios que sacaban a los animales a pasear, observándose asimismo valores menores en animales que paseaban con una mayor frecuencia, pudiendo asociarse valores bajos de CRP a situaciones que generan menos estrés para el animal.

7 BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Bibliografía

Farm Animal Welfare Council 1992 FAWC updates the five freedoms Veterinary Record 17: 357.

World Organization of Animal Health 2018 Introduction to the recommendations for animal welfare, Article 7.1.1. Page 1, in Terrestrial Animal Health Code 2018. World Organization for Animal Health (OIE).

World Health Organization (WHO) 2017. Leishmaniasis. Fact sheet. Updated April 2017.

Abernethy, T. J. and Avery, O. T., 1941. The occurrence during acute infections of a protein not normally in blood. *J Exp Med* 73, 173-182.

Abranches, P., Silva-Pereira, M. C., Conceicao-Silva, F. M., Santos-Gomes, G. M. and Janz, J. G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 77, 557-561.

Aich, P., Potter, A. A. and Griebel, P. J., 2009. Modern approaches to understanding stress and disease susceptibility: A review with special emphasis on respiratory disease. *Int J Gen Med* 2, 19-32.

Alayash, A. I., 2011. Haptoglobin: old protein with new functions. *Clin Chim Acta* 412, 493-498.

Alonso-Fauste, I., Andres, M., Iturralde, M., Lampreave, F., Gallart, J. and Alava, M. A., 2012. Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals. *J Proteomics* 75, 3015-3030.

Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. and Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57, 1-88.

Andersson, M. and Sevelius, E., 2001. Abnormal microheterogeneity of haptoglobin in serum from dogs with various diseases. *Vet Rec* 148, 14-17.

Arredouani, M., Matthijs, P., Van Hoeyveld, E., Kasran, A., Baumann, H., Ceuppens, J. L. and Stevens, E., 2003. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 108, 144-151.

Bibliografía

Arredouani, M., Matthys, P., Kasran, A., Baumann, H. and Ceuppen, J. L., 2001. Haptoglobin and the Th1/Th2 balance: hints from in vitro and in vivo studies. *Redox Rep* 6, 369-371.

Arthington, J. D., Eichert, S. D., Kunkle, W. E. and Martin, F. G., 2003. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *J Anim Sci* 81, 1120-1125.

Avrameas, S., 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6, 43-52.

Avrameas, S. and Ternynck, T., 1969. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* 6, 53-66.

Badaro, R., Jones, T. C., Carvalho, E. M., Sampaio, D., Reed, S. G., Barral, A., Teixeira, R. and Johnson, W. D., Jr., 1986. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 154, 1003-1011.

Ballou, S. P. and Kushner, I., 1992a. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* 37, 313-336.

Ballou, S. P. and Lozanski, G., 1992b. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* 4, 361-368.

Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. and Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24, 324-330.

Barrachina, L., Remacha, A. R., Soler, L., Garcia, N., Romero, A., Vazquez, F. J., Vitoria, A., Alava, M. A., Lamprave, F. and Rodellar, C., 2016. Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis. *Vet Immunol Immunopathol* 182, 74-78.

Barter, P. J., Nicholls, S., Rye, K. A., Anantharamaiah, G. M., Navab, M. and Fogelman, A. M., 2004. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 95, 764-772.

Barter, P. J. and Rye, K. A., 2006. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern Med* 259, 447-454.

Bibliografía

Bathen-Noethen, A., Carlson, R., Menzel, D., Mischke, R. and Tipold, A., 2008. Concentrations of acute-phase proteins in dogs with steroid responsive meningitis-arthritis. *J Vet Intern Med* 22, 1149-1156.

Baumann, H. and Gauldie, J., 1994. The acute phase response. *Immunol Today* 15, 74-80.

Becker, W., 1969. Determination of antisera titres using the single radial immunodiffusion method. *Immunochemistry* 6, 539-546.

Bhanumathy, C. D., Tang, Y., Monga, S. P., Katuri, V., Cox, J. A., Mishra, B. and Mishra, L., 2002. Itih-4, a serine protease inhibitor regulated in interleukin-6-dependent liver formation: role in liver development and regeneration. *Dev Dyn* 223, 59-69.

Borghetti, P., Saleri, R., Mocchegiani, E., Corradi, A. and Martelli, P., 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet Immunol Immunopathol* 130, 141-162.

Cafazzo, S., Maragliano, L., Bonanni, R., Scholl, F., Guarducci, M., Scarcella, R., Di Paolo, M., Pontier, D., Lai, O., Carlevaro, F., Bucci, E., Cerini, N., Carlevaro, L., Alfieri, L., Fantini, C. and Natoli, E., 2014. Behavioural and physiological indicators of shelter dogs' welfare: reflections on the no-kill policy on free-ranging dogs in Italy revisited on the basis of 15 years of implementation. *Physiol Behav* 133, 223-229.

Canalias, F., Pineiro, M., Pato, R., Pena, R., Bosch, L., Soler, L., Garcia, N., Lampreave, F., Saco, Y. and Bassols, A., 2018. Preparation of canine C-reactive protein serum reference material: A feasibility study. *Vet Clin Pathol* 47, 122-129.

Cantos-Barreda, A., Escribano, D., Ceron, J. J., Bernal, L. J., Furlanello, T., Tecles, F., Pardo-Marin, L. and Martinez-Subiela, S., 2018. Relationship between serum anti-Leishmania antibody levels and acute phase proteins in dogs with canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 260, 63-68.

Cao, W., Wang, X., Chen, T., Xu, W., Feng, F., Zhao, S., Wang, Z., Hu, Y. and Xie, B., 2018. Maternal lipids, BMI and IL-17/IL-35 imbalance in concurrent gestational diabetes mellitus and preeclampsia. *Exp Ther Med* 16, 427-435.

Carpintero, R., 2007. Estudio bioquímico y fisiopatológico de la apolipoproteína A-I porcina, una proteína plasmática de fase aguda negativa. Universidad de Zaragoza.

Carpintero, R., Alonso, C., Piñeiro, M., Iturralde, M., Andres, M., Le Potier, M. F., Madec, F., Alava, M. A., Piñeiro, A. and Lampreave, F., 2007. Pig major acute-phase protein and apolipoprotein A-I responses correlate with the clinical course of experimentally induced African Swine Fever and Aujeszky's disease. *Vet Res* 38, 741-753.

Carpintero, R., Pineiro, M., Andres, M., Iturralde, M., Alava, M. A., Heegaard, P. M., Jobert, J. L., Madec, F. and Lampreave, F., 2005. The concentration of apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute-phase processes in pigs. *Infect Immun* 73, 3184-3187.

Casella, S., Fazio, F., Russo, C., Giudice, E. and Piccione, G., 2013. Acute phase proteins response in hunting dogs. *J Vet Diagn Invest* 25, 577-580.

Caspi, D., Baltz, M. L., Snel, F., Gruys, E., Niv, D., Batt, R. M., Munn, E. A., Buttress, N. and Pepys, M. B., 1984. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology* 53, 307-313.

Caspi, D., Snel, F. W., Batt, R. M., Bennett, D., Rutteman, G. R., Hartman, E. G., Baltz, M. L., Gruys, E. and Pepys, M. B., 1987. C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res* 48, 919-921.

Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R. and Heinrich, P. C., 1989. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* 242, 237-239.

Cecilian, F., Giordano, A. and Spagnolo, V., 2002. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett* 9, 211-223.

Ceron, J. J., Eckersall, P. D. and Martynez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 34, 85-99.

Ceron, J. J., Pardo-Marin, L., Caldin, M., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., Tecles, F., Bernal, L., Baneth, G. and Martinez-Subiela, S., 2018. Use of acute phase proteins for the clinical assessment and management of canine leishmaniosis: general recommendations. *BMC Vet Res* 14, 196.

Conner, J. G., Eckersall, P. D., Ferguson, J. and Douglas, T. A., 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res Vet Sci* 45, 107-110.

Bibliografia

Crawford, K., Warman, S. M., Marques, A. I., Yool, D. A., Eckersall, P. D., Mcculloch, E., Lynn, K., Mellanby, R. J. and Gow, A. G., 2013. Serum haptoglobin concentrations in dogs with liver disease. *Vet Rec* 173, 579.

Chan, D. L., Rozanski, E. A. and Freeman, L. M., 2009. Relationship among plasma amino acids, C-reactive protein, illness severity, and outcome in critically ill dogs. *J Vet Intern Med* 23, 559-563.

Chase, D., Mclauchlan, G., Eckersall, P. D., Pratschke, J., Parkin, T. and Pratschke, K., 2012. Acute phase protein levels in dogs with mast cell tumours and sarcomas. *Vet Rec* 170, 648.

Choi-Miura, N. H., Sano, Y., Oda, E., Nakano, Y., Tobe, T., Yanagishita, T., Taniyama, M., Katagiri, T. and Tomita, M., 1995. Purification and characterization of a novel glycoprotein which has significant homology to heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor family from human plasma. *J Biochem* 117, 400-407.

Choi-Miura, N. H., Takahashi, K., Yoda, M., Saito, K., Hori, M., Ozaki, H., Mazda, T. and Tomita, M., 2000. The novel acute phase protein, IHRP, inhibits actin polymerization and phagocytosis of polymorphonuclear cells. *Inflamm Res* 49, 305-310.

Christensen, M., Jacobsen, S., Ichiyangi, T. and Kjølgaard-Hansen, M., 2012. Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline, and equine SAA. *Vet J* 194, 332-337.

Dabrowski, R., Kostro, K., Lisiecka, U., Szczubial, M. and Krakowski, L., 2009. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology* 72, 471-476.

Dabrowski, R., Kostro, K. and Szczubial, M., 2013. Concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in uterine arterial and peripheral blood in bitches with pyometra. *Theriogenology* 80, 494-497.

Dabrowski, R., Wawron, W. and Kostro, K., 2007. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. *Theriogenology* 67, 321-327.

Daveau, M., Jean, L., Soury, E., Olivier, E., Masson, S., Lyoumi, S., Chan, P., Hiron, M., Lebreton, J. P., Husson, A., Jegou, S., Vaudry, H. and Salier, J. P., 1998. Hepatic and extra-hepatic transcription of inter-alpha-inhibitor family genes

under normal or acute inflammatory conditions in rat. Arch Biochem Biophys 350, 315-323.

Delanghe, J. R. and Langlois, M. R., 2001. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. Clin Chim Acta 312, 13-23.

Dello, C. P., Belpaire, F. M., Kint, J. A. and Fraeyman, N. H., 1987. Dog alpha-1-acid glycoprotein: purification and biochemical characterization. J Pharmacol Methods 18, 335-345.

Dinareello, C. A., 2004. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. J Endotoxin Res 10, 201-222.

Dobryszczyka, W., Elwyn, D. H. and Kukral, J. C., 1969. Isolation and chemical composition of canine haptoglobin. Biochim Biophys Acta 175, 220-222.

Du Clos, T. W., 2000. Function of C-reactive protein. Ann Med 32, 274-278.

Du Clos, T. W. and Mold, C., 2001. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. Curr Opin Infect Dis 14, 289-293.

Duan, X., Yarmush, D., Berthiaume, F., Jayaraman, A. and Yarmush, M. L., 2005. Immunodepletion of albumin for two-dimensional gel detection of new mouse acute-phase protein and other plasma proteins. Proteomics 5, 3991-4000.

Dujardin, J. C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbil, Y. and Boelaert, M., 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis 14, 1013-1018.

Eckersall, D. (2008). Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias.

Eckersall, P., 2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. Revue de Médecine Vétérinaire 151, 577-584.

Eckersall, P. D. and Bell, R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. The Veterinary Journal 185, 23-27.

Eckersall, P. D., Conner, J. G. and Harvie, J., 1991. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. Vet Res Commun 15, 17-24.

Bibliografia

Eckersall, P. D., Conner, J. G. and Parton, H., 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. *Vet Rec* 124, 490-491.

Eckersall, P. D., Duthie, S., Safi, S., Moffatt, D., Horadagoda, N. U., Doyle, S., Parton, R., Bennett, D. and Fitzpatrick, J. L., 1999. An automated biochemical assay for haptoglobin: Prevention of interference from albumin. *Comparative Haematology International* 9, 117-124.

Eckersall, P. D., Saini, P. K. and McComb, C., 1996. The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha(1)-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 51, 377-385.

Eckersall, P. D., Young, F. J., Nolan, A. M., Knight, C. H., McComb, C., Waterston, M. M., Hogarth, C. J., Scott, E. M. and Fitzpatrick, J. L., 2006. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 89, 1488-1501.

Enginler, S. O., Ates, A., Diren Sigirci, B., Sontas, B. H., Sonmez, K., Karacam, E., Ekici, H., Evkuran Dal, G. and Gurel, A., 2014. Measurement of C-reactive protein and prostaglandin F₂alpha metabolite concentrations in differentiation of canine pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra. *Reprod Domest Anim* 49, 641-647.

Fazio, F., Casella, S., Giannetto, C., Giudice, E. and Piccione, G., 2015. Characterization of acute phase proteins and oxidative stress response to road transportation in the dog. *Exp Anim* 64, 19-24.

Fieni, F., Topie, E. and Gogny, A., 2014. Medical treatment for pyometra in dogs. *Reprod Domest Anim* 49 Suppl 2, 28-32.

Fournier, T., Medjoubi, N. N. and Porquet, D., 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1482, 157-171.

Fransson, B. A., Lagerstedt, A. S., Bergstrom, A., Hagman, R., Park, J. S., Chew, B. P., Evans, M. A. and Ragle, C. A., 2007. C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 17, 373-381.

Frohlander, N., Ljunggren, O. and Lerner, U. H., 1991. Haptoglobin synergistically potentiates bradykinin and thrombin induced prostaglandin biosynthesis in isolated osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 343-351.

Bibliografía

Fujise, H., Takanami, H., Yamamoto, M., Ohta, I., Yamamoto, S., Fukase, T., Naiki, M., Akihama, S., Ogawa, E. and Takahashi, R., 1992. Simple isolation of canine C-reactive protein (CRP) by phosphorylcholine (PC) affinity chromatography. *J Vet Med Sci* 54, 165-167.

Fukuda, Y. and Sassa, S., 1993. Effect of interleukin-11 on the levels of mRNAs encoding heme oxygenase and haptoglobin in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 297-302.

Gabay, C. and Kushner, I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340, 448-454.

García-Gil, F. A., Lampreave, F., Fuentes-Broto, L., Carpintero, R., Gonzalvo, E., García, J. J., Alvarez-Alegret, R., Alfaro, J., Orden, I. and Roda, L., 2010. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 as a marker of acute rejection in pancreas allotransplantation in pigs. *Transplant Proc* 42, 3063-3069.

García De Lorenzo Y Mateos, A., López Martínez, J. and Ssánchez Castilla, M., 2000. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva* 24, 353-360.

Gebhardt, C., Hirschberger, J., Rau, S., Arndt, G., Krainer, K., Schweigert, F. J., Brunnberg, L., Kaspers, B. and Kohn, B., 2009. Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 19, 450-458.

Giblett, E., 1974. *In* Structure and function of plasma proteins. Vol. 1. A.C. Allison, editor. Plenum Press, London. . 55-72.

Gonzalez-Ramon, N., Alava, M. A., Sarsa, J. A., Piñeiro, M., Escartin, A., Garcia-Gil, A., Lampreave, F. and Piñeiro, A., 1995. The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120. *FEBS Letter* 371, 227-230.

Gonzalez-Ramon, N., Hoebe, K., Alava, M. A., Van Leengoed, L., Piñeiro, M., Carmona, S., Iturralde, M., Lampreave, F. and Piñeiro, A., 2000. Pig MAP/ITI4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *Eur J Biochem* 267, 1878-1885.

Gonzalez, L. A., Ferret, A., Manteca, X., Ruiz-De-La-Torre, J. L., Calsamiglia, S., Devant, M. and Bach, A., 2008. Performance, behavior, and welfare of Friesian heifers housed in pens with two, four, and eight individuals per concentrate feeding place. *J Anim Sci* 86, 1446-1458.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177, 751-766.

Grabar, P. and Williams, C. A., 1953. [Method permitting the combined study of the electrophoretic and the immunochemical properties of protein mixtures; application to blood serum]. *Biochim Biophys Acta* 10, 193-194.

Gramiccia, M., 2011. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol* 181, 23-30.

Griebsch, C., Arndt, G., Raila, J., Schweigert, F. J. and Kohn, B., 2009. C-reactive protein concentration in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Vet Clin Pathol* 38, 421-425.

Gronlund, U., Hulten, C., Eckersall, P. D., Hogarth, C. and Persson Waller, K., 2003. Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Res* 70, 379-386.

Haas, M. J., Horani, M., Mreyoud, A., Plummer, B., Wong, N. C. and Mooradian, A. D., 2003. Suppression of apolipoprotein AI gene expression in HepG2 cells by TNF alpha and IL-1beta. *Biochim Biophys Acta* 1623, 120-128.

Hagman, R., 2018. Pyometra in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 48, 639-661.

Hammer, C. H., Jacobs, R. M. and Frank, M. M., 1989. Isolation and characterization of a novel plasma protein which binds to activated C4 of the classical complement pathway. *J Biol Chem* 264, 2283-2291.

Hayashi, S., Jinbo, T., Iguchi, K., Shimizu, M., Shimada, T., Nomura, M., Ishida, Y. and Yamamoto, S., 2001. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and alpha1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. *Vet Res Commun* 25, 117-126.

Heegaard, P. M., Klausen, J., Nielsen, J. P., Gonzalez-Ramon, N., Pineiro, M., Lampreave, F. and Alava, M. A., 1998. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 119, 365-373.

Heegaard, P. M., Miller, I., Sorensen, N. S., Soerensen, K. E. and Skovgaard, K., 2013. Pig alpha1-acid glycoprotein: characterization and first description in any species as a negative acute phase protein. *PLoS One* 8, e68110.

Hillstrom, A., Hagman, R., Tvedten, H. and Kjelgaard-Hansen, M., 2014. Validation of a commercially available automated canine-specific immunoturbidimetric method for measuring canine C-reactive protein. *Vet Clin Pathol* 43, 235-243.

Himmelfarb, M., Klopocki, E., Grube, S., Staub, E., Klamann, I., Hinzmann, B., Kristiansen, G., Rosenthal, A., Durst, M. and Dahl, E., 2004. ITIH5, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. *Cancer Lett* 204, 69-77.

Irwin, M. R. and Cole, S. W., 2011. Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems. *Nature reviews. Immunology* 11, 625-632.

Itoh, H., Motoi, Y., Tamura, K., Murata, H., Chiba, T., and Takeda, S., 1989. Serum alpha 1-acid glycoprotein in bovine leukosis and its effects on blastogenesis of lymphocytes. *Journal of Japanese Veterinary Medical Association*, 39-43.

Jasensky, A. K., Klenner, S., Einspanier, R. and Kohn, B., 2015. Evaluation of three different point-of-care tests for quantitative measurement of canine C-reactive protein. *Vet Clin Pathol* 44, 205-214.

Jergens, A. E., 2004. Clinical assessment of disease activity for canine inflammatory bowel disease. *J Am Anim Hosp Assoc* 40, 437-445.

Jitpean, S., Holst, B. S., Hoglund, O. V., Pettersson, A., Olsson, U., Strage, E., Sodersten, F. and Hagman, R., 2014a. Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. *Theriogenology* 82, 43-48.

Jitpean, S., Pettersson, A., Höglund, O. V., Holst, B. S., Olsson, U. and Hagman, R., 2014b. Increased concentrations of Serum amyloid A in dogs with sepsis caused by pyometra. *BMC Vet Res* 10, 273.

Jitpean, S., Strom-Holst, B., Emanuelson, U., Hoglund, O. V., Pettersson, A., Alneryd-Bull, C. and Hagman, R., 2014c. Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. *BMC Vet Res* 10, 6.

Kajikawa, T., Furuta, A., Onishi, T., Tajima, T. and Sugii, S., 1999. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Vet Immunol Immunopathol* 68, 91-98.

Kawai, C., 1994. Pathogenesis of acute myocardial infarction. Novel regulatory systems of bioactive substances in the vessel wall. *Circulation* 90, 1033-1043.

Kip, A. E., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H., De Vries, P. J. and Dorlo, T. P., 2015. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 1-14.

Kisiel, A. H., Mcduffee, L. A., Masaoud, E., Bailey, T. R., Esparza Gonzalez, B. P. and Nino-Fong, R., 2012. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *Am J Vet Res* 73, 1305-1317.

Kisilevsky, R. and Subrahmanyam, L., 1992. Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function. *Lab Invest* 66, 778-785.

Kjelgaard-Hansen, M. and Jacobsen, S., 2011. Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. *Clin Lab Med* 31, 51-70.

Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A. L. and Kristensen, A. T., 2003a. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol* 32, 81-87.

Kjelgaard-Hansen, M., Kristensen, A. T. and Jensen, A. L., 2003b. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50, 164-168.

Kjelgaard-Hansen, M., Strom, H., Mikkelsen, L. F., Eriksen, T., Jensen, A. L. and Luntang-Jensen, M., 2013. Canine serum C-reactive protein as a quantitative marker of the inflammatory stimulus of aseptic elective soft tissue surgery. *Vet Clin Pathol* 42, 342-345.

Kohler, W. and Prokop, O., 1978. Relationship between haptoglobin and *Streptococcus pyogenes* T4 antigens. *Nature* 271, 373.

Bibliografía

Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K. and Moestrup, S. K., 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.

Kumazaki, T., Urushibara, N. and Ishii, S., 1992. Amino acid sequence and disulfide-bridge location of canine haptoglobin. *J Biochem* 112, 11-19.

Kuribayashi, T., Shimizu, M., Shimada, T., Honjyo, T., Yamamoto, Y., Kuba, K. and Yamamoto, S., 2003. Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) levels in healthy and pregnant beagle dogs. *Exp Anim* 52, 377-381.

Kushner, I., 1982. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 389, 39-48.

Kushner, I., 1988. The acute phase response: an overview. *Methods Enzymol* 163, 373-383.

Kushner, I. and Rzewnicki, D. L., 1994. The acute phase response: general aspects. *Baillieres Clin Rheumatol* 8, 513-530.

Lampreave, F., Gonzalez-Ramon, N., Martinez-Ayensa, S., Hernandez, M. A., Lorenzo, H. K., Garcia-Gil, A. and Pineiro, A., 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* 15, 672-676.

Lampreave, F. and Pineiro, A., 1982. Characterization of a new alpha-glycoprotein as the major serum component in later fetal and newborn pigs. *Comp Biochem Physiol B* 72, 215-219.

Lampreave, F. and Pineiro, A., 1984. The major serum protein of fetal and newborn pigs: biochemical properties and identification as a fetal form of alpha 1-acid glycoprotein. *Int J Biochem* 16, 47-53.

Lecchi, C., Avallone, G., Giurovich, M., Roccabianca, P. and Ceciliani, F., 2009. Extra hepatic expression of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in normal bovine tissues. *Vet J* 180, 256-258.

Lee, W. C., Hsiao, H. C., Wu, Y. L., Lin, J. H., Lee, Y. P., Fung, H. P., Chen, H. H., Chen, Y. H. and Chu, R. M., 2003. Serum C-reactive protein in dairy herds. *Can J Vet Res* 67, 102-107.

Li, J., Chen, J. and Kirsner, R., 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 25, 9-18.

Bibliografía

Li, X., Li, B., Li, B., Guo, T., Sun, Z., Li, X., Chen, L., Chen, W., Chen, P., Mao, Y. and Zeng, Y., 2018. ITIH4: Effective Serum Marker, Early Warning and Diagnosis, Hepatocellular Carcinoma. *Pathol Oncol Res* 24, 663-670.

Lowrie, M., Penderis, J., Eckersall, P. D., Mclaughlin, M., Mellor, D. and Anderson, T. J., 2009a. The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs. *Vet J* 182, 125-130.

Lowrie, M., Penderis, J., Mclaughlin, M., Eckersall, P. D. and Anderson, T. J., 2009b. Steroid responsive meningitis-arteritis: a prospective study of potential disease markers, prednisolone treatment, and long-term outcome in 20 dogs (2006-2008). *J Vet Intern Med* 23, 862-870.

Maia, C. and Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158, 274-287.

Mancini, G., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235-254.

Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F. and Gravino, A. E., 2009. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Vet J* 182, 441-445.

Mansfield, C. S., James, F. E. and Robertson, I. D., 2008. Development of a clinical severity index for dogs with acute pancreatitis. *J Am Vet Med Assoc* 233, 936-944.

Marco-Ramell, A., Pato, R., Pena, R., Saco, Y., Manteca, X., Ruiz De La Torre, J. L. and Bassols, A., 2011. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Vet J* 190, e66-71.

Martin De La Fuente, A. J., Carpintero, R., Rodriguez Ferri, E. F., Alava, M. A., Lampreave, F. and Gutierrez Martin, C. B., 2010. Acute-phase protein response in pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33, 455-465.

Martinez-Subiela, S., Bernal, L. J. and Ceron, J. J., 2003. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am J Vet Res* 64, 1021-1026.

Martinez-Subiela, S., Caldin, M., Parra, M. D., Ottolini, N., Bertolini, G., Bernal, L. J., Garcia-Martinez, J. D. and Ceron, J. J., 2011a. Canine C-reactive protein

measurements in cerebrospinal fluid by a time-resolved immunofluorimetric assay. *J Vet Diagn Invest* 23, 63-67.

Martinez-Subiela, S. and Ceron, J. J., 2005. Validation of commercial assays for the determination of haptoglobin, C-reactive protein and serum amyloid A in dogs. *Arch. med. vet. [online]* 37, 61-66.

Martinez-Subiela, S., Ceron, J. J., Strauss-Ayali, D., Garcia-Martinez, J. D., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A., Caldin, M. and Baneth, G., 2014. Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37, 23-29.

Martinez-Subiela, S., Garcia-Martinez, J. D., Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Caldin, M., Bernal, L. J. and Ceron, J. J., 2013. Urinary C reactive protein levels in dogs with leishmaniasis at different stages of renal damage. *Res Vet Sci* 95, 924-929.

Martinez-Subiela, S., Ginel, P. J. and Ceron, J. J., 2004. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec* 154, 814-817.

Martinez-Subiela, S., Pardo-Marin, L., Tecles, F., Baneth, G. and Ceron, J. J., 2016. Serum C-reactive protein and ferritin concentrations in dogs undergoing leishmaniasis treatment. *Res Vet Sci* 109, 17-20.

Martinez-Subiela, S., Strauss-Ayali, D., Ceron, J. J. and Baneth, G., 2011b. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 180, 197-202.

Martinez-Subiela, S., Tecles, F., Eckersall, P. D. and Ceron, J. J., 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 150, 241-244.

Mato, E., Barcelo-Batllori, S., Orera, I., Selva, L., Corra, M., Gonzalez, C., Bell, O., Lerma, E., Moral, A., Perez, J. I. and De Leiva, A., 2015. The proteomic 2D-DIGE approach reveals the protein voltage-dependent anion channel 2 as a potential therapeutic target in epithelial thyroid tumours. *Mol Cell Endocrinol* 404, 37-45.

Mauricio, I. L., Stothard, J. R. and Miles, M. A., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16, 188-189.

Bibliografía

Mcgrotty, Y. L., Knottenbelt, C. M., Ramsey, I. K., Reid, S. W. and Eckersall, P. D., 2004. Evaluation of a rapid assay for canine C-reactive protein. *Vet Rec* 154, 175-176.

Mitchell, K. D., Kruth, S. A., Wood, R. D. and Jefferson, B., 2009. Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. *J Vet Intern Med* 23, 585-591.

Mohamed, E., Abdul-Rahman, P. S., Doustjalali, S. R., Chen, Y., Lim, B. K., Omar, S. Z., Bustam, A. Z., Singh, V. A., Mohd-Taib, N. A., Yip, C. H. and Hashim, O. H., 2008. Lectin-based electrophoretic analysis of the expression of the 35 kDa inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 fragment in sera of patients with five different malignancies. *Electrophoresis* 29, 2645-2650.

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J. A., Lucientes, J. and Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88, 491-493.

Mominoki, K., Nakagawa-Tosa, N., Morimatsu, M., Syuto, B. and Saito, M., 1995. Haptoglobin in Carnivora: a unique molecular structure in bear, cat and dog haptoglobins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 110, 785-789.

Moody, M. E., Mueller, L. D. and Soltis, D. E., 1993. Genetic variation and random drift in autotetraploid populations. *Genetics* 134, 649-657.

Moore, D. F., Rosenfeld, M. R., Gribbon, P. M., Winlove, C. P. and Tsai, C. M., 1997. Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* 21, 69-82.

Morimatsu, M., Syuto, B., Shimada, N., Fujinaga, T., Yamamoto, S., Saito, M. and Naiki, M., 1991. Isolation and characterization of bovine haptoglobin from acute phase sera. *J Biol Chem* 266, 11833-11837.

Murata, H., Shimada, N. and Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 168, 28-40.

Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y. and Tsujimoto, H., 2008. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci* 70, 127-131.

Navarro, M. A., Carpintero, R., Acin, S., Arbones-Mainar, J. M., Calleja, L., Carnicer, R., Surra, J. C., Guzman-Garcia, M. A., Gonzalez-Ramon, N., Iturralde,

M., Lampreave, F., Pineiro, A. and Osada, J., 2005. Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in experimental inflammation. *Cytokine* 31, 52-63.

Nayak, A. R., Shekhawat, S. D., Lande, N. H., Kawle, A. P., Kabra, D. P., Chandak, N. H., Badar, S. R., Raje, D. V., Daginawala, H. F., Singh, L. R. and Kashyap, R. S., 2016. Incidence and Clinical Outcome of Patients with Hypertensive Acute Ischemic Stroke: An Update from Tertiary Care Center of Central India. *Basic Clin Neurosci* 7, 351-360.

Nishimura, H., Kakizaki, I., Muta, T., Sasaki, N., Pu, P. X., Yamashita, T. and Nagasawa, S., 1995. cDNA and deduced amino acid sequence of human PK-120, a plasma kallikrein-sensitive glycoprotein. *FEBS Lett* 357, 207-211.

Oh, S. K., Pavlotsky, N. and Tauber, A. I., 1990. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J Leukoc Biol* 47, 142-148.

Okumura, Y., Kudo, J., Ikuta, T., Kurokawa, S., Ishibashi, H. and Okubo, H., 1985. Influence of acute-phase proteins on the activity of natural killer cells. *Inflammation* 9, 211-219.

Ouchterlony, O., 1949. In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand* 26, 516-524.

Owen, L. N., 1980. TNM classification of tumours in domestic animals, 1st ed. VPH/CMO/80.20. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Patel, B. N., Dunn, R. J., Jeong, S. Y., Zhu, Q., Julien, J. P. and David, S., 2002. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci* 22, 6578-6586.

Petersen, H. H., Nielsen, J. P. and Heegaard, P. M., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35, 163-187.

Pineiro, M., Pineiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., Toussaint, M. J. and Lampreave, F., 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet J* 173, 669-674.

Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Carpintero, R., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., Toussaint, M. J., Alava, M. A. and Lampreave, F., 2007a. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal* 1, 133-139.

Bibliografía

Piñeiro, M., Alava, M. A., Gonzalez-Ramon, N., Osada, J., Lasierra, P., Larrad, L., Piñeiro, A. and Lampreave, F., 1999. ITIH4 serum concentration increases during acute-phase processes in human patients and is up-regulated by interleukin-6 in hepatocarcinoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 224-229.

Piñeiro, M., Andres, M., Iturralde, M., Carmona, S., Hirvonen, J., Pyorala, S., Heegaard, P. M., Tjørnehoj, K., Lampreave, F., Piñeiro, A. and Alava, M. A., 2004. ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle during experimental infection. *Infection and Immunity* 72, 3777-3782.

Piñeiro, M., Pato, R., Soler, L., Peña, R., Garcia, N., Torrente, C., Saco, Y., Lampreave, F., Bassols, A. and Canalías, F., 2018. A new automated turbidimetric immunoassay for the measurement of canine C-reactive protein. *Vet Clin Pathol* 47, 130-137.

Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., Toussaint, M. J. and Lampreave, F., 2007b. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The Veterinary Journal* 173, 669-674.

Planellas, M., Bassols, A., Siracusa, C., Saco, Y., Gimenez, M., Pato, R. and Pastor, J., 2009. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. *Vet Clin Pathol* 38, 348-352.

Polticelli, F., Bocedi, A., Minervini, G. and Ascenzi, P., 2008. Human haptoglobin structure and function--a molecular modelling study. *FEBS J* 275, 5648-5656.

Pomorska-Mol, M., Markowska-Daniel, I., Kwit, K., Stepniewska, K. and Pejsak, Z., 2013. C-reactive protein, haptoglobin, serum amyloid A and pig major acute phase protein response in pigs simultaneously infected with H1N1 swine influenza virus and *Pasteurella multocida*. *BMC Vet Res* 9, 14.

Pu, X. P., Iwamoto, A., Nishimura, H. and Nagasawa, S., 1994. Purification and characterization of a novel substrate for plasma kallikrein (PK-120) in human plasma. *Biochim Biophys Acta* 1208, 338-343.

Pu, X. P. and Nagasawa, S., 1995. Purification and characterization of PK-120, a novel substrate for plasma kallikrein, from guinea pig plasma. *Biol Pharm Bull* 18, 837-841.

Pyorala, S., Hovinen, M., Simojoki, H., Fitzpatrick, J., Eckersall, P. D. and Orro, T., 2011. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Vet Rec* 168, 535.

Ramadori, G., Sipe, J. D. and Colten, H. R., 1985. Expression and regulation of the murine serum amyloid A (SAA) gene in extrahepatic sites. *J Immunol* 135, 3645-3647.

Rioux, J. A., Lanotte, G., Maazoun, R., Perello, R. and Pratlong, F., 1980. *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, the agent of the autochthonous oriental sore. Apropos of the biochemical identification of 2 strains isolated in the eastern Pyrenees. *C R Seances Acad Sci D* 291, 701-703.

Rooney, N. J., Gaines, S. A. and Bradshaw, J. W., 2007. Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiol Behav* 92, 847-854.

Rooney, N. J., Gaines, S. A. and Hiby, E., 2009. A practitioner's guide to working dog welfare. *Journal of Veterinary Behavior* 4, 127-134.

Sack, G. H., 2018. Serum amyloid A – a review. *Molecular Medicine* 24, 46.

Sacks, D. and Sher, A., 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3, 1041-1047.

Saco, Y., Docampo, M. J., Fàbrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F. and Bassols, A., 2003. Effect of transport stress on serum haptoglobin and pig-map in pigs. *Animal Welfare* 12, 403-409.

Saco, Y., Fina, M., Gimenez, M., Pato, R., Piedrafita, J. and Bassols, A., 2008. Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows. *Vet J* 177, 439-441.

Saco, Y., Martinez-Lobo, F., Cortey, M., Pato, R., Pena, R., Segales, J., Prieto, C. and Bassols, A., 2016. C-reactive protein, haptoglobin and Pig-Major acute phase protein profiles of pigs infected experimentally by different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 183, 9-15.

Saguchi, K., Tobe, T., Hashimoto, K., Sano, Y., Nakano, Y., Miura, N. H. and Tomita, M., 1995. Cloning and characterization of cDNA for inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP), a novel human plasma glycoprotein. *J Biochem* 117, 14-18.

Salamano, G., Mellia, E., Candiani, D., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G. and Doglione, L., 2008. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *Vet J* 177, 110-115.

Bibliografía

Salier, J. P., Rouet, P., Raguenez, G. and Daveau, M., 1996. The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J* 315 (Pt 1), 1-9.

Sasanelli, M., Paradies, P., De Caprariis, D., Greco, B., De Palo, P., Palmisano, D. and Carelli, G., 2007. Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. *Vet Res Commun* 31 Suppl 1, 335-338.

Schallig, H. D., Cardoso, L. and Semiao-Santos, S. J., 2013. Seroepidemiology of canine leishmaniosis in Evora (southern Portugal): 20-year trends. *Parasit Vectors* 6, 100.

Sendino, J. M., 1988. O-MAP, una nueva proteína de fase aguda en la oveja: aislamiento y caracterización. Universidad de Zaragoza.

Sheahan, D., Bell, R., Mellanby, R. J., Gow, A. G., Friend, E., Heller, J., Bence, L. M. and Eckersall, P. D., 2010. Acute phase protein concentrations in dogs with nasal disease. *Veterinary Record* 167, 895-899.

Sipe, J., 1999. Revised nomenclature for serum amyloid A (SAA). Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Part 2. *Amyloid* 6, 67-70.

Solano-Gallego, L., Miro, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. and The Leishvet, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 4, 86.

Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. and Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 39, 560-563.

Soler, L., Dabrowski, R., Garcia, N., Alava, M. A., Lampreave, F., Pineiro, M., Wawron, W., Szczubial, M. and Bochniarz, M., 2018. Acute-phase inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 levels in serum and milk of cows with subclinical mastitis caused by *Streptococcus* species and coagulase-negative *Staphylococcus* species. *J Dairy Sci*.

Sorensen, N. S., Tegtmeier, C., Andresen, L. O., Pineiro, M., Toussaint, M. J., Campbell, F. M., Lampreave, F. and Heegaard, P. M., 2006. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 157-168.

Sproston, N. R. and Ashworth, J. J., 2018. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol* 9, 754.

Stults, N. L., Lee, Y. C., Hoppe, C. A., Kawaguchi, K., Kohda, S., Takagahara, I., Koishi, T. and Liu, T. Y., 1987. Preparation of phosphorylcholine derivatives of bovine serum albumin and their application to the affinity chromatography of C-reactive protein. *Anal Biochem* 161, 567-573.

Subbannayya, Y., Mir, S. A., Renuse, S., Manda, S. S., Pinto, S. M., Puttamalles, V. N., Solanki, H. S., Manju, H. C., Syed, N., Sharma, R., Christopher, R., Vijayakumar, M., Veerendra Kumar, K. V., Keshava Prasad, T. S., Ramaswamy, G., Kumar, R. V., Chatterjee, A., Pandey, A. and Gowda, H., 2015. Identification of differentially expressed serum proteins in gastric adenocarcinoma. *J Proteomics* 127, 80-88.

Takiguchi, M., Fujinaga, T., Naiki, M., Mizuno, S. and Otomo, K., 1990. Isolation, characterization, and quantitative analysis of C-reactive protein from horses. *Am J Vet Res* 51, 1215-1220.

Tanaka, H., Shimazawa, M., Takata, M., Kaneko, H., Tsuruma, K., Ikeda, T., Warita, H., Aoki, M., Yamada, M., Takahashi, H., Hozumi, I., Minatsu, H., Inuzuka, T. and Hara, H., 2013. ITIH4 and Gpx3 are potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 260, 1782-1797.

Tang, Y., Kitisin, K., Jogunoori, W., Li, C., Deng, C. X., Mueller, S. C., Resson, H. W., Rashid, A., He, A. R., Mendelson, J. S., Jessup, J. M., Shetty, K., Zasloff, M., Mishra, B., Reddy, E. P., Johnson, L. and Mishra, L., 2008. Progenitor/stem cells give rise to liver cancer due to aberrant TGF-beta and IL-6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2445-2450.

Taylor, K. D. and Mills, D. S., 2006. The development and assessment of temperament test for adult companion dogs. *Journal of Veterinary Behavior* 1, 94-108.

Tecles, F., Caldin, M., Zanella, A., Membiela, F., Tvarijonaviciute, A., Subiela, S. M. and Ceron, J. J., 2009. Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 21, 214-219.

Tecles, F., Spiranelli, E., Bonfanti, U., Ceron, J. J. and Paltrinieri, S., 2005. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *J Vet Intern Med* 19, 865-870.

Bibliografía

Tecles, F., Subiela, S. M., Petrucci, G., Panizo, C. G. and Ceron, J. J., 2007. Validation of a commercially available human immunoturbidimetric assay for haptoglobin determination in canine serum samples. *Vet Res Commun* 31, 23-36.

Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M. and Barral, A., 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22, 32-40.

Thompson, D., Pepys, M. B. and Wood, S. P., 1999. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 7, 169-177.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

Tvarijonaviciute, A., Martinez, S., Gutierrez, A., Ceron, J. J. and Tecles, F., 2011. Serum acute phase proteins concentrations in dogs during experimentally short-term induced overweight. A preliminary study. *Res Vet Sci* 90, 31-34.

Vandenplas, M. L., Moore, J. N., Barton, M. H., Roussel, A. J. and Cohen, N. D., 2005. Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. *Am J Vet Res* 66, 1509-1516.

Veiga, A. P., Price, C. A., De Oliveira, S. T., Dos Santos, A. P., Campos, R., Barbosa, P. R. and Gonzalez, F. H., 2008. Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein. *J Vet Diagn Invest* 20, 224-228.

Viitanen, S. J., Lappalainen, A. K., Christensen, M. B., Sankari, S. and Rajamaki, M. M., 2017. The Utility of Acute-Phase Proteins in the Assessment of Treatment Response in Dogs With Bacterial Pneumonia. *J Vet Intern Med* 31, 124-133.

Villanueva, S. O., L.; Solano-Gallego, L., 2013. Patogénesis y respuesta inmunitaria. En: *Leishmaniosis, una revisión actualizada*. (ed:Servet).33-50.

Volanakis, J. E., Clements, W. L. and Schrohenloher, R. E., 1978. C-reactive protein: purification by affinity chromatography and physicochemical characterization. *Journal of Immunological Methods* 23, 285-295.

Vreugdenhil, A. C., Dentener, M. A., Snoek, A. M., Greve, J. W. and Buurman, W. A., 1999. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J Immunol* 163, 2792-2798.

Bibliografía

Wasunna, K. M., Raynes, J. G., Were, J. B., Muigai, R., Sherwood, J., Gachihi, G., Carpenter, L. and Mcadam, K. P., 1995. Acute phase protein concentrations predict parasite clearance rate during therapy for visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89, 678-681.

Weimer, H. E., Mehl, J. W. and Winzler, R. J., 1950. Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. *J Biol Chem* 185, 561-568.

Yamamoto, S., Shida, T., Okimura, T., Otabe, K., Honda, M., Ashida, Y., Furukawa, E., Sarikaputi, M. and Naiki, M., 1994. Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *Vet Q* 16, 74-77.

Yang, F., Haile, D. J., Berger, F. G., Herbert, D. C., Van Beveren, E. and Ghio, A. J., 2003. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L402-409.

Ye, R. D. and Sun, L., 2015. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J Leukoc Biol* 98, 923-929.

Yuki, M., Itoh, H. and Takase, K., 2010. Serum alpha-1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. *Vet Clin Pathol* 39, 65-71.

Yuki, M., Itoh, H., Tamura, K., Nishii, N. and Takase, K., 2008. Isolation, characterization and quantitation of canine alpha-1-acid glycoprotein. *Vet Res Commun* 32, 533-542.

Yuki, M., Machida, N., Sawano, T. and Itoh, H., 2011. Investigation of serum concentrations and immunohistochemical localization of alpha1-acid glycoprotein in tumor dogs. *Vet Res Commun* 35, 1-11.

Zhang, N., Dietrich, M. A. and Lopez, M. J., 2013. Canine intra-articular multipotent stromal cells (MSC) from adipose tissue have the highest in vitro expansion rates, multipotentiality, and MSC immunophenotypes. *Vet Surg* 42, 137-146.

Zúñiga, J. M., Orellana, J. M. and Tur, J. A., 2011. *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio*. (ed. SECAL. Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio) Universidad de Alcalá I, 411-431.

Bibliografía

8 ANEXOS

Anexo Figura 1. Ficha a rellenar para cada animal en los centros de protección.

			CODIGO:		Centro/Animal/Mes/Año XX/XXXXX/XX/XX	
FECHA: RECOGIDO ENTREGADO			VACUNADO: TOS PERRERA: SI/NO MOQUILLO: SI/NO PARVOVIROSIS: SI/NO HEPATITIS: SI/NO PARAINFLUENZA: SI/NO LEPTOSPIROSIS: SI/NO RABIA: SI/NO			
IDENTIFICACION:	SI	NO				
SEXO	MACHO	HEMBRA	EDAD:			
RAZA:			MESTIZO: SI/NO		PESO:	
TAMAÑO:			NIVEL / ESTADO NUTRICIONAL:			
PEQUEÑO (< 5 KG)			OBESO			
MEDIANO (5 - 15 KGS)			SOBREPESO			
GRANDE (> 15 KGS)			NORMAL			
			DELGADO			
			MUY DELGADO			
DATOS COMPORTAMIENTO						
COMPORTAMIENTO:			AGRESIVIDAD			
APÁTICO	SI/NO		MUESTRA AGRESIVIDAD CON PERROS: SI/NO			
EQUILIBRADO	SI/NO		MUESTRA AGRESIVIDAD CON PERSONAS: SI/NO			
NERVIOSO	SI/NO		MUESTRA AGRESIVIDAD CON OTROS ANIMALES: SI/NO			
EXPLORACION CLÍNICA			TEMPERATURA:			
AP. RESPIRATORIO NORMAL:						
AP. DIGESTIVO NORMAL:						
SIST. NERVIOSO NORMAL:						
AP. LOCOMOTOR NORMAL:						
PIEL Y MUCOSAS NORMAL:						
ECTOPARASITOS NORMAL:						
OBSERVACIONES						

		CODIGO:	Centro/Animal/Mes/Año XX/XXXXX/XX/XX
FECHA:			
CARACTERISTICAS DE INSTALACIONES			
EL CENTRO DISPONE DE CUARTO /SALA EXPLORACIÓN CLÍNICA:		SI/NO	
PASO A CUARENTENA		PASO A CHENIL ORDINARIO	
SI/NO		SI/NO	
CHENIL ORDINARIO:			
DIMENSIONES:		USO:	
LARGO:		INDIVIDUAL SI/NO	
ANCHO:		COMPARTIDO SI/NO	
CARACTERISTICAS:			
ZONA DESCANSO		SI/NO	
ZONA COMIDA		SI/NO	
ZONA EXCRECIÓN		SI/NO	
HAY CONTACTO VISUAL CON OTROS PERROS		SI/NO	
HAY CONTACTO VISUAL CON OTRAS ESPECIES		SI/NO	ESPECIE:
HAY ESTÍMULOS AUDITIVOS		SI/NO	
LOS ESTÍMULOS AUDITIVOS SON:			
FUERTES		SI/NO	DÉBILES SI/NO
PERMANENTES		SI/NO	PUNTUALES SI/NO
PRÓXIMOS		SI/NO	LEJANOS SI/NO
HAY ZONA COMÚN DE EJERCICIO EN EL CENTRO		SI/NO	
HAY VOLUNTARIOS EN EL CENTRO		SI/NO	
SE PASEA A LOS PERROS	CUANTAS VECES		CUANTO TIEMPO
SI/NO			
HAY RUTINAS DE TRABAJO EN EL CENTRO:			
LIMPIEZA: SI/NO		COMIDA: SI/NO	PASEO: SI/NO
OBSERVACIONES:			

	CODIGO:	Centro/Animal/Mes/Año XX/XXXXX/XX/XX
---	----------------	---

	FECHA	OBSERVACIONES
1ª MUESTRA (ENTRADA)		
2ª MUESTRA (DOS DIAS DESDE ENTRADA)		
3ª MUESTRA (QUINCE DIAS DESDE ENTRADA)		
4ª MUESTRA (UN MES DESDE ENTRADA)		

Anexo Tabla 1. Identificación mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS de las proteínas purificadas. Se indican el número de la figura y el número de la banda que se muestra de cada proteína en el texto. Los nombres de las proteínas en cursiva corresponden a secuencias que han sido deducidas a partir de la secuencia genómica. Secuencias obtenidas de la base de datos NCBI de la especie *canis lupus familiaris*.

Identificación	Figura	Banda	Proteína	Nº acceso	Mascot score	Péptidos	Secuencia (%)
MALDI TOF	1	1	<i>Cadena pesada 4 del inhibidor inter α tripsina</i>	gi 545560457	588	11	20
	1	2	Albúmina	gi 3319897	648	12	25
	1	3	Cadena pesada B de inminoglobulina gamma	gi 17066526	358	6	19
	1	4	<i>Polipéptido 5 de la cadena ligera de las inmunoglobulinas</i>	gi 73995681	170	3	32
	3	5	Proteína C-reactiva	gi 345797697	322	12	32
	3	6	Proteína C-reactiva	gi 345797697	413	14	50
	7	7	Cadena pesada de la haptoglobina	gi 258499	878	25	37
	9	8	Alfa ₁ glicoproteína ácida	gi 345777714	480	15	34
LC-MS/MS	1	1	<i>Cadena pesada 4 del inhibidor inter α tripsina</i>	gi 545560457	181,51	17	20

Anexo Tabla 2. Sintomatología recogida a lo largo de todo el estudio en animales infectados con *L. infantum*. SO; síntomas oculares, SC; síntomas cutáneos, LA; linfadenopatía, MA; mucosas anémicas, On; onicogriposis, A; atrofia muscular del músculo temporal, E; esplenomegalia, PC; puntuación clínica.

Nº	Tiempo	Peso	SO	SC	LA	MA	On	A	E	PC
1	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	3m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	4m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	5m PI	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	6m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7m PI	0	1	0	0	0	0	1	0	2
	8m PI	0	1	0	0	0	0	1	0	2
	9m PI	0	1	0	0	0	0	1	0	2
	10m PI	0	1	0	0	0	0	1	0	2
2	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	3m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5m PI	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	6m PI	1	1	0	0	1	0	0	1	4
	7m PI	1	1	1	0	0	0	1	0	4
	8m PI	0	1	1	1	0	0	1	0	4
	9m PI	0	2	1	1	0	0	1	1	6
	10m PI	RIP	2	1	1	0	0	1	0	5
3	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	2m PI	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	3m PI	0	1	1	1	0	0	0	0	3
	4m PI	0	0	1	1	0	0	0	0	2
	5m PI	0	1	1	1	0	0	1	1	5
	6m PI	0	1	1	0	0	0	0	0	2
	7m PI	0	0	1	0	0	0	1	0	2
	8m PI	0	0	1	1	0	0	1	0	3
	9m PI	0	0	1	1	0	0	1	0	3
	10m PI	0	0	0	0	0	0	1	0	1
4	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3m PI	0	1	0	1	0	0	0	0	2
	4m PI	0	1	0	1	0	0	0	0	2
	5m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7m PI	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	8m PI	0	1	1	1	0	0	0	0	3
	9m PI	0	1	1	0	0	0	0	0	2
	10m PI	0	1	1	0	0	0	0	0	2
5	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	2m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	3m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	4m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	5m PI	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	6m PI	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	7m PI	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	8m PI	0	2	0	1	0	0	0	0	3
	9m PI	0	2	0	1	0	0	0	0	3
	10m PI	0	2	0	1	0	0	0	1	4

N°	Tiempo	Peso	SO	SC	LA	MA	On	A	E	PC
6	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5m PI	0	0	0	0	1	0	1	0	2
	6m PI	0	1	0	0	1	0	1	0	3
	7m PI	0	1	0	0	0	0	1	0	2
	8m PI	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	9m PI	0	0	0	0	0	0	1	0	1
10m PI	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
7	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4m PI	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	5m PI	0	1	0	1	0	0	0	0	2
	6m PI	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	7m PI	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	8m PI	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	9m PI	0	0	1	0	0	0	0	0	1
10m PI	0	0	1	0	0	0	0	1	2	
8	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5m PI	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	6m PI	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	7m PI	0	1	1	0	0	0	0	0	2
	8m PI	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	9m PI	0	1	1	0	0	0	1	0	3
10m PI	0	2	1	0	1	0	1	0	5	
9	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	2m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	4m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5m PI	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	6m PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7m PI	1	1	0	0	0	0	1	0	3
	8m PI	0	0	0	1	0	0	1	0	2
	9m PI	0	0	0	0	0	0	1	0	1
10m PI	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
10	T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	2m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	3m PI	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	4m PI	1	1	0	1	0	0	0	0	3
	5m PI	1	2	0	0	1	0	0	0	4
	6m PI	1	2	0	0	0	0	0	0	3
	7m PI	1	2	0	0	0	0	0	0	3
	8m PI	1	2	0	0	0	0	0	0	3
	9m PI	0	2	1	1	0	0	0	0	4
10m PI	0	2	1	1	0	0	0	1	5	

9 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambios neuroendocrinos, metabólicos, hematopoyéticos y hepáticos producidos en el organismo durante la respuesta de fase aguda.	18
Tabla 2. Clasificación de las PFAs según la especie animal	27
Tabla 3. Ejemplos de patologías caninas en las que se han evaluado las PFAs.	39
Tabla 4. Métodos analíticos comerciales validados en la literatura, para la determinación de las principales PFAs en perro.	44
Tabla 5. Condiciones específicas de la curva de calibrado, dilución de muestra y dilución de conjugado para cada uno de los ELISAS desarrollados.	84
Tabla 6. Secuencia de los cebadores (D) directo y (R) reverso diseñada para cada gen, tamaño del producto amplificado (pb) y temperatura de anillamiento (Tm).	92
Tabla 7. Descripción de los signos clínicos establecidos en la exploración clínica para calcular la puntuación clínica de cada paciente.	94
Tabla 8. Estudio de la precisión del ELISA de la ITIH4 canina.	119
Tabla 9. Estudio de la precisión del ELISA de la Hp canina.	122
Tabla 10. Comparativa de las condiciones para el análisis de CRP canina del nuevo ensayo inmunturbidimétrico en un analizador Olympus AU 400 y adaptado a microplaca.	126
Tabla 11. Estudio de la precisión para la determinación de CRP mediante inmunturbidimetría en placa microtiter.	127
Tabla 12. Correlación entre las concentraciones de las diferentes PFA determinadas en el estudio.	132
Tabla 13. Parámetros clínicos en grupo control y en el grupo piometra.	133
Tabla 14. Cálculo del valor del coeficiente de correlación Rho de Spearman, entre las PFAs estudiadas (ITIH4, CRP, y Hp) en el total de la población de animales del estudio (n=25).	135
Tabla 15. Puntuación clínica (PC) asignada para cada animal infectado, clasificación según criterios sintomatológicos y valores de CRP (mg/L), ITIH4 (mg/mL), Hp (mg/mL) y GPA (mg/mL) cuantificados.	138
Tabla 16. Cálculo del valor del coeficiente de correlación Rho de Spearman, entre las PFAs estudiadas (ITIH4, CRP, Hp), las titulaciones de anticuerpos obtenidas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA y la puntuación clínica asignada (PC).	142
Tabla 17. Valores obtenidos en el cálculo del intervalo de referencia para CRP, ITIH4, Hp y GPA, en animales clínicamente sanos.	151
Tabla 18. Valores promedio y rangos obtenidos para ITIH4 y de GPA en Beagles y el resto de razas.	152

Tabla 19. Valores promedio y rangos obtenidos de ITIH4 en machos y hembras en la raza Beagle.	153
Tabla 20. Características de los centros de protección	169
Tabla 21. Comparación ente las secuencias de aminoácidos de ITIH4 en cerdo, humano, vaca y perro.....	Error! Marcador no definido.

10 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la respuesta de fase aguda.....	19
Figura 2. Ciclo de vida de <i>L. infantum</i> y formas de transmisión sin vector.	50
Figura 3. Implicación de los ejes hipotalámico-pituitario-adrenocorticotrópico (HPA) y simpático-adreno-medular (SAM) en la respuesta fisiológica al estrés, a partir de la activación del sistema nervioso central (SNC) ante una señal de peligro o alarma..	55
Figura 1. Análisis por SDS-PAGE (10 %) de las fracciones obtenidas durante la purificación de la ITIH4 canina.	101
Figura 2. Análisis por inmunoelectroforesis de los antisueros anti ITIH4.....	103
Figura 3. Análisis por SDS PAGE 12 % de la CRP canina.	104
Figura 4. Caracterización del antisuero anti CRP de perro desarrollado.....	105
Figura 5. Análisis de las fracciones de suero de perro precipitadas con sulfato amónico saturado (ssa)..	106
Figura 6. Cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-200).....	107
Figura 7. Análisis mediante SDS-PAGE (12 %) de las fracciones obtenidas durante las diferentes etapas del proceso de purificación de Hp de perro.....	108
Figura 8. Análisis por inmunoelectroforesis (a) y por Western blot (b) del antisuero anti Hp de perro desarrollado	109
Figura 9. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación de GPA..	110
Figura 10. Análisis por inmunoelectroforesis del antisuero anti GPA canino.....	111
Figura 11. Curva dosis-respuesta del calibrador para cuantificación de ITIH4 canina por IR.....	112
Figura 12. Principales parámetros determinados en los estudios de validación del método de inmunodifusión radial para la cuantificación de la ITIH4 canina mediante IR.	114
Figura 13. Principales parámetros determinados en los estudios de validación del método de inmunodifusión radial para la cuantificación de la CRP canina mediante IR.	115
Figura 14. Principales parámetros determinados en los estudios de validación del método de inmunodifusión radial para la cuantificación de la Hp canina mediante IR.	116
Figura 15. Principales parámetros determinados en los estudios de validación del método de inmunodifusión radial para la cuantificación de la GPA canina mediante IR.	117
Figura 16. Estudio de la linealidad mediante dilución de un suero de perro de concentración conocida.....	120
Figura 17. Comparativa de los valores obtenidos mediante ELISA e inmunodifusión radial (IR)..	121
Figura 18. Estudio de la linealidad en ELISA de Hp mediante dilución de un suero de perro de concentración conocida.....	123

Figura 19. Comparativa de los valores obtenidos mediante ELISA e IR para Hp de perro.	124
Figura 20. Características analíticas del método inmunoturbidimétrico para la cuantificación de CRP canina.. ..	125
Figura 21. Estudio de la linealidad mediante dilución de un suero de perro de concentración conocida.....	128
Figura 22. Comparativa de los valores obtenidos mediante el método inmunoturbidimétrico para CRP canina adaptado a placa y con el analizador Olympus AU400 para CRP de perro.....	129
Figura 24. Evolución de las PFAs caninas en perras tras cirugía mayor.....	130
Figura 25. Comparativa de los niveles de las PFAs caninas en perros sanos y perros afectados por piometra.....	134
Figura 26. Representación de los valores de las PFAs en muestras de suero, para el grupo de animales no infectado y para el grupo de animales infectado.. ..	137
Figura 27. Representación comparativa de los niveles de expresión de mRNA en muestras hepáticas.....	138
Figura 28. Evolución de la concentración de las PFA en animales infectados con <i>L.</i> <i>infantum</i>	140
Figura 29. Representación de la evolución de los valores de CRP y la puntuación clínica de cada uno de los animales.....	144
Figura 30. Representación de la evolución de los valores de ITIH4 y la puntuación clínica de cada uno de los animales.....	147
Figura 31. Representación de la evolución de los valores de Hp y la puntuación clínica de cada uno de los animales.....	148
Figura 32. Distribución de los valores de PFAs en sueros de perros sanos.....	150
Figura 33. Comparativa de los valores de PFAs en función de la raza.	152
Figura 34. Comparativa de los valores de PFA entre machos y hembras en la población de Beagles.	153
Figura 35. Comparativa de los valores de PFA entre machos y hembras en el grupo de animales que engloba varias razas.....	154
Figura 36. Valores de PFA en perros agrupados según la edad: cachorros, adultos jóvenes y adultos.....	155
Figura 37. Distribución de los valores de CRP en los animales en el momento de la llegada al centro.	156

Figura 38. Distribución de los valores de ITIH4 en los animales en el momento de la llegada al centro.	158
Figura 39. Distribución de los valores de Hp en los animales en el momento de la llegada al centro.	159
Figura 40. Evolución de los niveles de CRP durante la permanencia de los animales en los centros de protección.	160
Figura 41. Comparativa de la concentración de CRP (media \pm SD) entre los distintos centros de protección, para cada tiempo de toma de muestra.	162
Figura 42. Evolución de los niveles de ITIH4 durante la permanencia de los animales en los centros de protección.	163
Figura 43. Comparativa de la concentración de ITIH4 (media \pm SD) entre los distintos centros de protección, para cada tiempo de toma de muestra.	165
Figura 44. Evolución de los niveles de Hp durante la permanencia de los animales en los centros de protección.	166
Figura 45. Comparativa de la concentración de Hp (media \pm SD) entre los distintos centros de protección, para cada tiempo de toma de muestra.	168
Figura 46. Comparativa de los valores de CRP en los animales entregados y recogidos en los centros de protección.	170
Figura 47. Valores de CRP en los animales agrupados en función de su estado nutricional: Muy delgado, delgado, normal y obeso-sobrepeso.	172
Figura 48. Valores de CRP en los animales agrupados en función de su comportamiento: apático, equilibrado, nervioso y agresivo.	174
Figura 49. Valor promedio de CRP para los animales alojados en cada uno de los centros participantes en el estudio y características de cada centro.	175
Figura 50. Valores de CRP en función de la frecuencia del paseo en toda la población y en animales sin sintomatología clínica.	176

11 ABREVIATURAS

Listado de abreviaturas más frecuentes.

ACTH Hormona adrenocorticotrópica

Apo Apolipoproteína

CRP Proteína C-reactiva

GPA α 1-glicoproteína ácida

HDL Lipoproteínas de alta densidad (High ensity lipoproteins)

Hp Haptoglobina

IFI Inmunfluorescencia indirecta

IL Interleuquina

INF Interferón

IR Inmunodifusión radial

ITI Inhibidor de tripsina inter α

ITIH4 Cadena pesada 4 del inhibidor de tripsina inter α (Inter- α Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4)

L. infantum *Leishmania infantum*

Lcan Leishmaniasis canina

NK Natural Killer

PAMP Patrones moleculares asociados a patógenos

PFA Proteína de Fase Aguda

Pig-MAP Pig major acute phase protein

RFA Respuesta de Fase Aguda

SAA Amiloide sérico A

SDS Dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate)

SRIS Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica

TLR Receptores de patrones de reconocimiento (Toll Like Receptors)

TNF Factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor)

WBC Recuento total de glóbulos blancos (total white blood cell count)