

Biomarcador clínico para leishmaniosis canina: inmunocomplejos circulantes

La leishmaniosis canina (CanL) es una zoonosis causada por *Leishmania infantum* (L. infantum), en la que los perros son el principal reservorio de la infección.

Perros infectados incapaces de controlar la infección desarrollan una fuerte respuesta humoral con elevados niveles de anticuerpos que, junto a los antígenos del parásito, forma los inmunocomplejos circulantes (CIC). Cuando los CIC se depositan en órganos y tejidos, producen diferentes manifestaciones clínicas entre las que se pueden incluir como vasculitis, uveítis, dermatitis y especialmente glomerulonefritis e insuficiencia renal.

En los últimos años se ha descrito un método para detectar los niveles de CIC en suero de perros infectados, estableciéndose una correlación positiva entre éstos y la gravedad de la enfermedad. Además, se ha establecido una correlación entre los niveles de CIC y los parámetros más usados en la práctica clínica actualmente. En este sentido, se ha confirmado que los valores de CIC son mayores en perros con elevado título de anticuerpos ($p < 0,0001$, $r = 0,735$), anemia ($p < 0,0001$), disproteinemia ($p < 0,0001$) y proteinuria ($p = 0,004$).

Los animales tratados que respondieron bien al tratamiento mostraron niveles decrecientes de CIC ($p < 0,0001$), mientras que aquellos que no responden al tratamiento o tienen recaídas, mantienen niveles elevados.

Según los resultados obtenidos, se puede confirmar que los CIC son un biomarcador con valor diagnóstico y pronóstico y una herramienta complementaria de gran utilidad para monitorizar la progresión de la enfermedad, la eficacia del tratamiento y la detección de recaídas.

Parody de la Fuente N.¹, Guimarães Sarquis J.², Carnés Sánchez J.¹, Miró Corrales G.²

1. LetiPharma SLU

2. Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis canina (CanL) es una enfermedad zoonótica causada por el parásito *Leishmania infantum* y transmitida por el insecto vector *Phlebotomus perniciosus*¹ siendo el perro el principal reservorio², siendo un serio problema de salud tanto en veterinaria como en medicina humana.

En animales incapaces de controlar la infección se desencadena una fuerte respuesta humoral que da lugar a títulos elevados de anticuerpos³. Estos anticuerpos (IgG e IgM), proteínas del complemento y antígenos del parásito forman los inmunocomplejos circulantes (CIC)⁴.

La acumulación de CIC provoca su depósito en órganos^{5,6}, causando diversas patologías entre las que se incluyen el daño renal^{7,8}, con un papel fundamental en el pronóstico de la enfermedad y esencial para la estadificación clínica⁹. Recientemente se ha descrito que la vacunación contra la CanL, en

caso de infección posterior, es capaz de controlar la sintomatología grave y reducir la progresión de la enfermedad, vía reducción de los CIC¹⁰.

En este sentido, la cuantificación de CIC puede ser un biomarcador de enfermedad tanto para diagnóstico, como para rastrear la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento¹¹.

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de CIC en perros con CanL en diferentes estadios de la enfermedad e investigar la correlación con la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población experimental

Se incluyeron 44 perros del Hospital Veterinario (Universidad Complutense, Madrid) con consentimiento informado de los propietarios y clasificados según LeishVet[9].

Se incluyeron machos y hembras, no vacunados frente a leishmaniosis ni tratados en los dos meses anteriores con ningún fármaco leishmanicida/leishmanistático. Se excluyeron perros infectados con otros patógenos vectoriales.

Aislamiento y cuantificación de CIC

A partir del suero, los CIC se aislaron mediante precipitación con polietilenglicol (PEG). El precipitado se reconstituyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M para su determinación. La cuantificación se realizó mediante ELISA *Leishmania*-específico[12]. El valor de corte se estableció como la media de OD+2dvst del grupo control (sanos).

Tratamiento

El tratamiento fue determinado por un veterinario especialista basándose en: historia clínica, examen físico y parámetros bioquímicos. Los perros infectados sanos y los de estadio I no recibieron

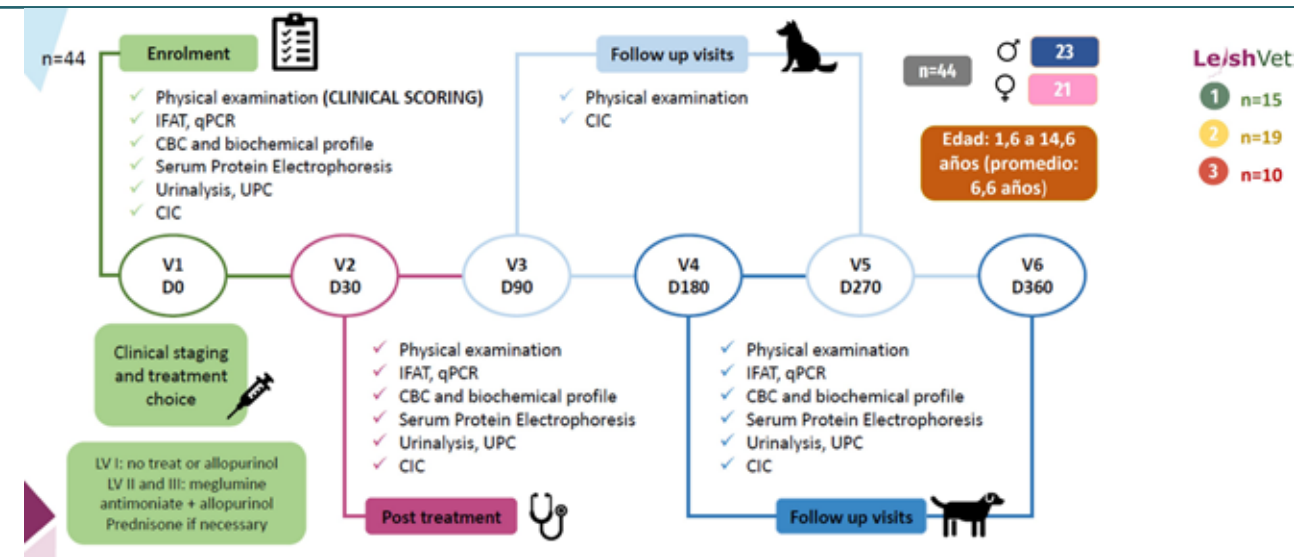


Figura 1: protocolo del estudio

tratamiento o únicamente alopurinol (10 mg/kg q12h durante 6-12 meses). Los perros en estadio II ó III fueron tratados con una combinación de antimonio de meglumina (50 mg/kg q12h durante 28 días) y alopurinol. En algunos casos fue necesario la administración de prednisona (0,5 mg/kg q12h durante 3-4 semanas) en estadio III para controlar el daño renal.

La respuesta al tratamiento y el número de recaídas se evaluó durante 12 meses. Los perros que respondieron bien al tratamiento mostraron una mejoría clínica y en parámetros laboratoriales, sin recaídas. Se consideró que los perros no respondieron adecuadamente al tratamiento cuando experimentaron recaídas durante el estudio o no mostraron mejoría.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó SAS v9.4 (SAS Institute Inc. 143 Cary, NC, EE. UU.), SPSS Statistics v.28 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.) y GraphPad Prism 10. La significación se estableció en $p \leq 0,05$.

Las variables empleadas para el análisis fueron: edad (2-4 años: adulto joven, 5-8 años: adulto maduro, ≥ 9 años: sénior), título de IFAT (< 200 negativo, 200-400 bajo, 800-1600 medio, > 1600 alto) y ratio albúmina/globulina (A/G)

($> 0,8$ normal, 0,7-0,8 disproteinemia leve, 0,5-0,69; moderada; $< 0,5$ grave).

Los valores de CIC presentaron una distribución no paramétrica. (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,001$). El análisis comparativo entre variables de diferentes grupos se realizó mediante Kruskal-Wallis (post-test Bonferroni). El análisis de las correlaciones se realizó mediante el test de Spearman. La capacidad de los CIC para identificar con precisión la recaída se calculó mediante el área bajo la curva ROC (AUC).

RESULTADOS

CIC y clasificación LeishVet

Al inicio del estudio, 15 perros fueron clasificados como estadio I, 20 como estadio II, 9 como estadio III/IV. Los perros en estadio I mostraron niveles de CIC significativamente más bajos que los clasificados en los estadios II y III ($p < 0,0001$), sin diferencias entre los grupos II o III ($p = 0,485$).

CIC e IFAT

Se detectaron diferencias significativas en los niveles de CIC entre los grupos con títulos de anticuerpos negativos, bajos, medios o altos ($p < 0,0001$). Se observó correlación positiva entre CIC e IFAT ($r = 0,735$; $p < 0,0001$).

CIC y parámetros laboratoriales

Se observaron diferencias significativas en los niveles de CIC en perros anémicos ($p < 0,0001$) y una correlación negativa entre el hematocrito y los CIC ($r = -0,547$).

Los CIC fueron significativamente más elevados ($p < 0,0001$) en perros con hiperproteinemia. Además, se encontró una correlación positiva entre CIC y proteína total ($r = 0,533$, $p < 0,0001$).

Los perros con disproteinemia mostraron niveles significativamente más elevados de CIC ($p < 0,0001$), y una correlación negativa entre CIC y el ratio A/G ($r = -0,618$). No se detectaron diferencias entre los perros con disproteinemia leve ($p = 1,0$), moderada ($p = 0,419$) o grave ($p = 0,121$). Los perros con proteinuria límite (UPC=0,2-0,5) presentaron niveles de CIC superiores a los perros sin proteinuria (UPC $> 0,5$) ($p = 0,035$, $r = 0,172$).

Los perros con hipoalbuminemia mostraron niveles de CIC significativamente elevados ($p = 0,02$). Se observó una correlación negativa entre CIC y niveles de albúmina ($r = -0,306$).

Los animales con hiperglobulemia (beta o gamma) mostraron niveles significativamente más altos de CIC ($p < 0,0001$) y una correlación positiva con los CIC ($r = 0,444$).

y 0,720 para beta y gamma globulina respectivamente).

CIC y respuesta al tratamiento

Los niveles de CIC disminuyeron tras el tratamiento, detectándose diferencias significativas en CIC entre la primera (D0) y la última visita (D360) ($p=0,022$).

Los 44 perros se clasificaron en buenos y malos respondedores (28 y 11 respectivamente; 5 abandonaron estudio). Los buenos respondedores mostraron niveles de CIC significativamente menores que los malos respondedores ($p<0,0001$).

CIC y recidiva

Los ocho perros que sufrieron recaída/s presentaron niveles de CIC significativamente más altos que los que no recayeron ($p<0,0001$).

Los CIC se mostraron como un discriminador de recaída (curva ROC: AUC=0,808, $p<0,0001$), estableciéndose el valor de corte para identificar una recaída en 1,539 OD (sensibilidad 82,4%; especificidad 70,9%).

DISCUSIÓN

Perros en estadios de enfermedad avanzada muestran niveles de CIC más altos¹², asociados a mayor riesgo de patología, menor calidad de vida y reducción de supervivencia¹³.

En 2019 Parody et al, propusieron que los CIC podían ser un marcador en CanL y desarrollaron un método validado, siguiendo las recomendaciones del NIH¹⁴, para determinar sus niveles en suero. Su especificidad y solidez mostraron su utilidad como biomarcador de diagnóstico, progresión de enfermedad y eficacia de tratamiento¹⁰.

Los valores de CIC fueron significativamente más bajos en perros en etapas tempranas (estadio I) que en estadios avanzados II ó III.

La anemia es una de las anomalías más frecuentes en CanL, que esta correlacionada con la gravedad de los signos clínicos¹⁵ y la carga parasitaria¹⁶. También la disproteinemia se observa con frecuencia siendo extremadamente útil para diagnóstico y seguimiento de CanL¹⁷. En este estudio se observó una correlación entre los niveles CIC y el hematocrito ($r=0,524$), las proteínas totales ($r=0,507$), las globulinas beta ($r=0,426$) y gamma ($r=0,673$), y el ratio A/G ($r=-0,647$). Igualmente, los perros con anemia y/o disproteinemia presentaron niveles de CIC significativamente más elevados.

El IFAT es la referencia diagnóstica en CanL, y correlaciona con los signos clínicos^{18,19}. Se demostró que los perros con IFAT alto tienen niveles de CIC significativamente más altos que los de título bajo ($p<0,0001$) y una correlación positiva entre CIC e IFAT ($r=0,735$).

Por otro lado, los buenos respondedores presentaron niveles de CIC significativamente más bajos en comparación con los respondedores deficientes ($p<0,0001$). Sugiriendo que medir los CIC antes y después del tratamiento podría servir para evaluar eficacia.

Los perros que experimentaron una recaída postratamiento presentaron niveles de CIC significativamente más elevados ($p<0,0001$). Esto se relaciona con datos que indican que los inmunocomplejos contribuye al establecimiento de infecciones crónicas en ratón y humanos²⁰. Es importante destacar que el análisis de la curva ROC reveló que los CIC eran un buen discriminador de la recaída (AUC=0,808) y que el punto de corte óptimo para identificar con precisión la recaída era 1,539 OD.

CONCLUSIONES

Los niveles de CIC correlacionan con las herramientas más empleadas para el diagnóstico de CanL en veterinaria.

Los perros que mostraron una respuesta favorable al tratamiento mostraron niveles de CIC en descenso. Por el contrario, los perros que mostraron una respuesta deficiente al tratamiento y recaídas clínicas recurrentes mostraron niveles altos de CIC. En estos perros, la vigilancia es esencial para permitir un tratamiento rápido y específico y prevenir daños irreversibles en los órganos debido a la deposición de CIC.

El uso de CIC como un biomarcador para monitorizar la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento en CanL es muy prometedor.

REFERENCIAS

- 1.- Willen, L., P. Mertens, and P. Volf, Evaluation of the rSP03B sero-strip, a newly proposed rapid test for canine exposure to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018. 12(8): p. e0006607.
- 2.- Dantas-Torres, F., The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Vet Parasitol*, 2007. 149(3-4): p. 139-46.
- 3.- Jamal, F., et al., Identification of *Leishmania donovani* antigen in circulating immune complexes of visceral leishmaniasis subjects for diagnosis. *PLoS One*, 2017. 12(8): p. e0182474.
- 4.- Poli, A., et al., Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*, 1991. 57(4): p. 444-52.
- 5.- Lopez, R., et al., Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1996. 43(8): p. 469-74.
- 6.- Miles, S.A., et al., A role for IgG immune complexes during infec-

tion with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*, 2005. 201(5): p. 747-54.

7.- Nieto, C.G., et al., Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 1992. 45(1-2): p. 33-47.

8.- Solano-Gallego, L., et al., Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003. 10(5): p. 849-55.

9.- Solano-Gallego, L., et al., *LeishVet* guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 2011. 4: p. 86.

10.- Cacheiro-Llaguno, C., et al., Vaccination with LetiFend(R) reduces circulating immune complexes in dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vaccine*, 2020. 38(4): p. 890-896.

11.- Jaiswal, P., et al., Glycoproteins in circulating immune complexes are biomarkers of patients with Indian PKDL: A study from endemic districts of West Bengal, India. *PLoS One*, 2018. 13(2): p. e0192302.

12.- Parody, N., et al., Circulating immune complexes levels correlate with the progression of canine leishmaniasis in naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 2019. 274: p. 108921.

13.- Pereira, M.A., et al., Prognostic Factors and Life Expectancy in Canine Leishmaniasis. *Vet Sci*, 2020. 7(3).

14.- Osuna, C., et al., Laboratory validation of an ELISA method to measure circulating immune complexes levels in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 2022. 254: p. 110518.

15.- Ribeiro, R.R., et al., Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2013. 22(3): p. 373-8.

16.- Torrecilha, R.B.P., et al., Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med*, 2016. 132: p. 83-87.

17.- Rodriguez, A., et al., Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and

after treatment. *J Vet Intern Med*, 2006. 20(3): p. 495-8.

18.- Koutinas, A.F. and C.K. Koutinas, Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*/chagasi. *Vet Pathol*, 2014. 51(2): p. 527-38.

19.- Proverbio, D., et al., Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 412808.

20.- Buxbaum, L.U., *Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. 7(5): p. e2224.