

INMUNOGLOBULINAS G, M Y A EN PLASMA CANINO

Jiménez, A. (*), Barrera, R. (*), Mañé, M^a. C. (*), López, R. (*), y Molleda, J.M. (**)

(*) Departamento de Medicina y Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. 10071 Cáceres.

(**) Departamento de Patología Clínica Veterinaria. Facultad de Veterinaria 14005. Córdoba.

RESUMEN

En el presente trabajo se procede a la determinación de las proteínas totales e inmunoglobulinas G, M y A en plasmas procedentes de 51 perros clínicamente canos, con el fin de aportar el patrón normal de dichas inmunoglobulinas en los perros de nuestro entorno. El valor medio obtenido para las proteínas totales plasmáticas fue de $6,04 \pm 0,09$ g/dl., observándose la existencia de una interacción entre sexo y edad con una certeza del 99%. El valor medio obtenido para la IgG fue de $1.510,98 \pm 634,59$ mg/100 ml; para la IgM de $136,86 \pm 94,50$ mg/100 ml. y para la IgA, de $21,45 \pm 11,30$ mg/100 ml. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre sexo, edad o en su interacción. Estos valores coinciden con los aportados por la mayoría de los autores consultados a excepción de la IgA plasmática, en la que se obtiene una concentración media algo inferior a la encontrada en la bibliografía consultada. Se discuten las razones por las que dicha población presenta esta concentración media de IgA plasmática sin que padezca, ninguno de sus integrantes, inmunodeficiencia de dicha inmunoglobulina.

SUMMARY

Total proteins and G, M and A immunoglobulins of plasma from 51 healthy dogs were measured in the present work. Obtaining the reference values of these immunoglobulins in dog of our area was the aim of this rearching.

Mean value for plasma total proteins was $6,04 \pm 0,09$ g/dl. Interaction between sex and age ($P < 0,01$) was noted. Mean value for IgG was $1.510,98$

$\pm 634,59$ mg/100 ml.; $136,86 \pm 94,50$ mg/100 ml for IgM and $21,45 \pm 11,30$ mg/100 ml. for IgA.

There were no significant differences between sex, age or its interaction. These values, except IgA, coincide with those recorded by most of the authors consulted about. IgA mean values are rather lesser and the reasons of the absence of IgA immunodeficiency in this population are still discussed.

INTRODUCCION

Las investigaciones sobre las inmunoglobulinas caninas comenzaron con PATTERSON et al. (1), que describieron una serie de inmunoglobulinas de alta y baja migración electroforética, que contienen respectivamente anticuerpos precipitantes y no precipitantes, así como una gammaglobulina de migración lenta y con coeficiente de sedimentación 6,7S, a la que llamaron gamma-G.

Estas investigaciones fueron continuadas por otros autores (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) concluyendo que en el suero del perro existen 5 clases de inmunoglobulinas: G, M, A, D y E. De la IgG se conocen, además, 4 subclases: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG_{2c} (7).

Los valores medios obtenidos por los diferentes autores para la IgG son muy distintos (Tabla D), oscilando entre 920 mg/100 ml (9) y 2.649 mg/100 ml (10). Para la IgM, el rango indicado por los autores consultados es menos extenso (Tabla D), oscilando entre 145 mg/100 ml. (5) y 175 mg/100 ml (10). Con la IgA ocurre algo parecido a la IgG. La dispersión de datos según el autor consultado es considerable, como se puede apreciar en la Tabla I, y se encuentran comprendidos entre

unos valores medios de 26 mg/100 ml (13) y 124,42 mg/100 ml (14).

Esta dispersión se convierte en una seria dificultad a la hora de interpretar los resultados, sobre todo en el momento de enjuiciar una deficiencia de alguna clase concreta de inmunoglobulina. En muchas ocasiones diagnosticamos una deficiencia de IgA en perros que no la padecen, sencillamente porque los rangos normales de esta inmunoglobulina son muy dispares según los datos elaborados por los autores que consultemos.

Por todo ello, y teniendo en cuenta el gran número de factores que pueden incidir sobre la tasa normal de inmunoglobulinas séricas, pensamos que es conveniente que cada laboratorio de análisis clínicos establezca sus propios valores de normalidad. Para lo cual, presentamos en este trabajo los resultados de una experiencia realizada en una población de perros sanos del entorno en el que nos encontramos trabajando.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de esta experiencia hemos empleado un total de 51 perros, clínicamente sanos, de diferentes razas, y con edades comprendidas entre 8 y 108 meses.

La extracción de muestras de sangre se realizó mediante punción de la vena cefálica, utilizando heparina como anticoagulante. Se separó la fracción plasmática y se congeló a -30°C hasta el momento de su análisis.

Para la determinación de las proteínas totales plasmáticas se utilizó el método de BIURET. Como el color producido con la reacción de BIURET puede variar sensiblemente según la naturaleza de las distintas proteínas plasmáticas, se utilizó un suero control (Seriscan Normal QCA) en lugar de albúmina pura.

La cuantificación de las inmunoglobulinas plasmáticas se realizó en placas comerciales (Laboratorios MILES) según la técnica de inmunodifusión radial simple descrita por MANCINI et al. (15) y modificada por FAHEY y MCKELVEY (16), reservando cuatro pocillos de cada placa para los correspondientes patrones de concentración conocida. Para la IgA se han empleado patrones de 15, 31, 62 y 125 mg/100 ml; para la IgG, de 250, 500, 1.200 y

2.400 mg/100 ml. y para la IgM, de 31, 62, 125 y 250 mg/100 ml.

Con los diámetros obtenidos con cada uno de los patrones estándares de referencia, se construyó una gráfica patrón en papel semilogarítmico, para calcular la concentración de cada inmunoglobulina de las muestras problema expresada en mg/100 ml. Posteriormente, las placas fueron introducidas en solución salina, teñidas con Negro Amido y decoloradas con una solución de ácido acético y glicerina.

RESULTADOS

Los valores obtenidos para los diferentes parámetros estudiados se encuentran reseñados en la Tabla II. Para el correspondiente estudio estadístico, se dividieron los animales en dos grupos de acuerdo con la variable sexo (machos y hembras) formados por 21 y 30 animales respectivamente, estableciendo según la edad otros dos grupos (adultos y jóvenes), constituidos respectivamente por 18 y 33 animales. Se efectuaron todas las interacciones posibles, para lo que se realizó un análisis de varianza a doble vía con interacción.

El valor medio obtenido para las proteínas totales plasmáticas fue de $6,04 \pm 0,09$ g/dl. Las concentraciones medias encontradas para los diferentes subgrupos sexo-edad están indicadas en la Tabla III. De acuerdo con el estudio estadístico realizado para este parámetro, con una certeza del 99%, aparece una interacción entre sexo y edad, y el test de Tuckey efectuado indica, con una certeza del 95%, que es debido a los altos valores obtenidos en las hembras adultas, frente a las bajas concentraciones encontradas en los machos adultos y en los machos jóvenes.

El valor medio obtenido para la IgA en nuestra experiencia fue de $21,45 \pm 11,30$ mg/100 ml (Tabla IV). El análisis de varianza a doble vía efectuado indicó que no existen diferencias significativas entre sexo, edad, ni en su interacción.

La concentración media para la IgG plasmática fue de $1.510,98 \pm 634,59$ mg/100 ml. (Tabla IV). Del mismo modo que para la IgA, el análisis de varianza demostró la no existencia de

diferencias significativas entre los diferentes subgrupos sexo-edad.

Por último, la tasa media para la IgM fue de $136,86 \pm 94,60$ mg/100ml (Tabla IV) y, como en las restantes inmunoglobulinas plasmáticas, tampoco existen diferencias significativas entre los diferentes subgrupos.

DISCUSION

Proteínas totales

El valor medio obtenido para este parámetro es de $6,04 \pm 0,09$ g/dl, comprendido dentro de los límites normales indicados en la literatura consultada (17, 18, 19, 20). Coincidimos con todos los autores mencionados en que, a la vista de los resultados obtenidos, las proteínas totales son uno de los parámetros que se encuentran de forma más estable en el plasma.

IgA

La media obtenida para la IgA plasmática fue de $21,45 \pm 11,30$ mg/100 ml. Este valor es bastante semejante al encontrado por DEBUYSSCHER et al (13), de 26,00 mg/100 ml. y es inferior a los aportados por el resto de los autores consultados (Tabla I), que oscilan entre 35,00 mg/100 ml., encontrados por FELSBERG et al. (21) y 103,20 mg/100 ml., aportado por MOROFF et al. (22). Puede comprobarse que existe una gran heterogeneidad en los datos obtenidos por los distintos autores para la IgA del perro, pues el valor medio indicado por MOROFF et al. (22) es unas tres veces superior al obtenido por FELSBERG et al. (21). A este respecto, WHITBREAD et al. (23) afirman que los distintos datos que aparecen en la literatura deben estar relacionados, más que con una concentración muy variable de IgA sérica en la especie canina, con problemas de técnica. Así, la fuente utilizada para obtener los estándares de referencia es un factor de gran importancia a tener en cuenta, lo mismo que el peso molecular de los mismos, que puede afectar a la migración de las moléculas a través del gel. Mientras que en algunos trabajos se ha usado IgA sérica, en otros se ha empleado IgA secretora y en otros una mezcla de ambas. Cuando FAHEY y MCKELVEY (16) realizaron su modificación a la técnica de MANCINI et al. (15) observaron que el peso molecular de los estándares de referencia era un dato fundamental, por

los resultados dispares que se podían obtener, debido a la heterogeneidad de pesos moleculares con los que se presenta la IgA en el suero humano. Ellos observaron que si el suero utilizado como control contiene formas de IgA de mayor peso molecular, los halos de precipitación formados por los problemas son menores. Otro factor potencial al que pueden deberse las diferencias es la distinta fórmula empleada para interpretar los halos de difusión aunque, al menos en teoría, todas deben dar los mismos resultados.

En este estudio, las placas empleadas para la cuantificación de esta inmunoglobulina son de total confianza. Están preparadas por incorporación de cadenas alfa-específicas anti-IgA. La IgA canina usada para la inmunización ha sido aislada de líquidos secretores mediante precipitación con sulfato amónico y técnicas cromatográficas habituales. En cuanto a los estándares de referencia, son sueros con concentraciones de IgA conocidas, según se demostró al someterlos a una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, en la que se comprobó que no son inmunoglobulinas purificadas, sino sueros completos convenientemente diluidos y conservados. No podemos considerar, pues, que la concentración obtenida por nosotros esté influida por la diferencia existente entre el peso molecular de la IgA de los estándares y el de la IgA de los plasmas problema, ya que los patrones son sueros de perros con concentración de IgA conocida y, por tanto, tendrán que formar círculos de inmunodifusión del mismo tamaño que los problemas, al ser su peso molecular semejante al de la IgA de éstos. Además, REYNOLDS y JOHNSON (5), demuestran que los valores cuantitativos obtenidos en la inmunodifusión radial del perro, al utilizar estándares de IgA procedentes de calostro, son muy similares a los obtenidos cuando se emplea IgA sérica. A este respecto, hay que recordar que la IgA sérica canina es, en su mayor parte, dimérica, como la forma secretora. MOROFF et al. (22) son los autores que señalan el valor de IgA sérica más alto, 103,20 mg/100 ml., mientras que DEBUYSSCHER et al. (13) obtienen, como nosotros, un valor inferior (26,00 mg/100 ml.) y, en todos los casos, se utiliza un equipo adquirido en los mismos laboratorios,

lo que confirma lo anteriormente expuesto. MOROFF et al. (22) afirman que concentraciones de IgA sérica inferiores a las medias aceptadas como normales en la bibliografía consultada aparecen frecuentemente en perros sanos, como ocurre en el hombre.

Los estudios realizados sobre inmunodeficiencia de IgA en el perro, al contrario de lo que sucede en el hombre, están muy poco documentados (24) y se suelen hacer en poblaciones sospechosas de la misma por padecer infecciones recurrentes respiratorias y digestivas. Pero los resultados obtenidos, aunque dan una media inferior a la de los perros empleados como control, comprenden un rango muy variable de valores (10, 21, 22) que no aclaran el problema. Animales en los que se ha comprobado la inmunodeficiencia por otros métodos complementarios, como la cuantificación de linfocitos B y T, el test de transformación de linfocitos, la activación policlonal de linfocitos, etc., presentan concentraciones de IgA sérica inferiores a 5,00 mg/100 ml. (21).

IgG

La concentración media plasmática detectada en la población de perros estudiada es de $1510,98 \pm 634,59$ mg/100 ml. Coincidimos con los valores medios indicados como normales por la mayoría de los autores consultados (5, 8, 13, 14, 21, 22, 25). Sin embargo, otros autores obtienen medias más bajas, como REYNOLDS y JOHNSON (5) que indican una concentración media de 925,00 mg/100 ml. en perros de razas puras y que atribuyen a que estos animales se mueven en ambientes menos adversos que los mestizos; HEDDLE y ROWLEY (6), que en un trabajo realizado en catorce perros obtienen un valor de 980,00 mg/100 ml. y, por último, FELLEMBERG (9) que considera como normal un valor medio de 920,00 mg/100 ml. (Tabla I). Por el contrario, GLICKMAN et al. (10), en una población de Beagles, obtienen una concentración media de 2.694,00 mg/100 ml., bastante superior a la aportada por los restantes autores.

IgM

La concentración media de IgM en el plasma de los animales estudiados es de $136,86 \pm 94,60$ mg/100 ml. y coincide con los autores consultados (5, 7, 8, 9, 14, 21). Por todo ello, la IgM representa la segunda inmunoglobulina

cuantitativamente más importante en el plasma del perro, en lo que igualmente coincidimos con lo encontrado en la literatura revisada.

BIBLIOGRAFIA

- (1) PATTERSON, R., ROBERTS, M. and PRUZANSKY, J.J. (1968): Types of Canine Serum Immunoglobulins. *J. Immunol.* 101: 687.
- (2) JOHNSON, J.P. and VAUGHAN, J.H. (1967): Canine Immunoglobulins. I. Evidence for Six Immunoglobulin Classes. *J. Immunol.* 98: 923.
- (3) JOHNSON, J.S., VAUGHAN, J.H. and SWIHER, S.N. (1967): Canine Immunoglobulins. II Antibody Activities in Six Immunoglobulin Classes. *J. Immunol.* 98:935.
- (4) VAERMAN, J.P. and HEREMANS, J.F. (1968): The Immunoglobulins of the Dog. I. Identification of Canine Immunoglobulins Homologous to Human IgA and IgM. *Immunochemistry.* 5:425.
- (5) REYNOLDS, H.Y. and JOHNSON, J.S. (1970): Quantitation of Canine Immunoglobulins. *J. Immunol.* 103:698.
- (6) HEDDLE, R.J. and ROWLEY, D. (1975): Dog Immunoglobulins. I. Immunochemical Characterization of Dog Serum, Parotid Saliva, Colostrum, Milk and Small Bowel Fluid. *Immunology.* 29:185.
- (7) SCHULTZ, R.D. (1974): Immunologic Disorders in the Dog and the Cat. *Vet. Clinics N. Amer.* 4:153.
- (8) OLSEN, R.G. and KRAKOWKA, S. (1979): *Inmunología e Inmunopatología de los Animales Domésticos.* México: «El Manual Moderno», S.A.
- (9) FELLEMBERG, R. (1982): *Compendio de Inmunología General.* Zaragoza: Acribia.
- (10) GLICKMAN, L.T., SHOFR, F.S., PAYTON, A.J., LASTER, L.L. and FELSBURG, P.J. (1988): Survey of Serum IgA, IgG, and IgM Concentrations in a Large Beagle Population in Which IgA deficiency had Been Identified. *Am. J. Vet. Res.* 49:1240.
- (11) VAERMAN, J.P., HEREMANS, J.F. and VAN KERCKHOVEN, G. (1969): Identification of IgA in Several Mammalian Species. *J. Immunol.* 103:1421.
- (12) REYNOLDS, H.Y. and JOHNSON, J.S. (1970): Canine Immunoglobulins III. Distribution of Immunoglobulins in Colostrum and Isolation of Secretory IgA and 7S-gamma-1. *J. Immunol.* 104:1000.
- (13) DEBUYSSCHER, E.V., BREITSCHWERDT, E.B. and MCLACHLAN, N.J. (1988): Elevated Serum IgA Associated with Immuno-proliferative Enteropathy of Basenji Dogs: Lack of Evidence for Alpha Heavy-Chain Disease or Enhanced Intestinal IgA Secretion. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20:41.
- (14) GORMAN, N.T. and HALLIWELL, R.E.W. (1989): The Immunoglobulins: Structure, Genetics and Function. En: Halliwell, R.E. Ed. *Veterinary Clinical Immunology.* Philadelphia: W.B. Saunders Co.

- (15) MANCINI, G., CARBONARA, A.G. and HEREMANS, J.F. (1965): Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion. *Immunochemistry*. 2:235.
- (16) FAHEY, J.L. and MCKELVEY, E.M. (1965): Quantitative Determination of Serum Immunoglobulins in Antibody-Agar Plates. *J. Immunol.* 91:84.
- (17) SCHALM, O.W., JAIN, N.C. y CORROLL, E.J. (1975): *Hematología Veterinaria*. Buenos Aires. Hemisferio Sur.
- (18) COLES, E.H. (1989): *Diagnóstico y Patología en Veterinaria*. México: Interamericana.
- (19) KANEKO, J.J. (1980): Serum Proteins and the Dysproteinemias. En: Kaneko, J.J. Ed. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. London: Academic Press.
- (20) KIRK W. (1989): *Current Veterinary Therapy «X»*. Small Animal Practice. Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- (21) FELSBURG, P.J., GLICKMAN, L.T. and JEZYK, P. (1985): Selective IgA Deficiency in the Dog. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 36:297.
- (22) MOROFF, S.D., HURVITZ, A.I., PETERSON, M.E., SAUNDERS, L. and NOONE, K.E. (1986): IgA Deficiency in Shar-pei Dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 13:181.
- (23) WHITBREAD, T.J., BATT, R.M. and GARTH-WAITE, G. (1984): Relative Deficiency of Serum IgA in the German Shepherd Dog: a Breed ABnormality. *Res. Vet. Sci. ce.* 37:350.
- (24) GUILFORD, W.G. (1988): Primary Immunodeficiency Diseases of the Dogs and Cats. *Res. Digest. Friskies.* 24:1.
- (25) TIZARD, I. (1987): *Veterinary Immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co.

AUTOR	IgG	IgM	IgA
Reynolds y Johnson (5)*	925	156	83
Reynolds y Johnson (5) **	1.445	145	79
Heddle y Rowley (6)	980	170	50
Olsen y Krakowka (8)	1.400	160	66
Fellenberg (9)	920	160	83
Felsburg et al. (21)	1.235	130	35
Moroff et al. (22)	1.699	--	103
Tizard (25)	1.500	170	85
Debuysscher et al. (13)	1.571	148	26
Glickman et al. (10)	2.649	175	68
Gorman y Halliwell (14)	1.421	148	124

* Razas puras

** Razas indefinidas

Tabla I: Valores medios normales de inmunoglobulinas plasmáticas caninas, expresados en mg/100 ml., según distintos autores.

Nº	SEXO	EDAD meses	P.T. g/dl	IgA mg/100ml.	IgG mg/100 ml.	IgM mg/100 ml.
1	Macho	15	5,00	16	1.700	160
2	Hembra	17	5,06	16	1.000	120
3	Hembra	8	5,90	20	1.300	62
4	Macho	10	6,20	10	800	26
5	Macho	24	5,26	10	850	110
6	Hembra	12	5,30	45	1.000	160
7	Hembra	17	5,89	16	1.400	125
8	Macho	12	5,80	20	2.300	160
9	Hembra	48	6,63	10	760	26
10	Macho	72	5,69	20	1.300	170
11	Hembra	36	5,63	16	1.050	62

N°	SEXO	EDAD meses	P.T. g/dl	IgA mg/100ml.	IgG mg/100 ml.	IgM mg/100 ml.
12	Hembra	36	6,45	32	2.400	125
13	Macho	12	7,15	16	1.300	90
14	Macho	96	5,93	16	1.700	160
15	Macho	84	6,94	65	2.400	125
16	Hembra	12	5,26	16	2.400	35
17	Hembra	24	7,80	45	1.700	110
18	Hembra	108	7,15	16	1.300	90
19	Macho	48	5,70	27	1.000	90
20	Hembra	108	6,15	27	1.700	100
21	Hembra	12	6,42	16	1.300	140
22	Hembra	12	5,80	27	1.500	125
23	Macho	9	5,90	10	2.400	450
24	Macho	24	5,60	16	2.400	35
25	Hembra	84	5,99	16	1.300	140
26	Hembra	36	7,99	20	1.000	110
27	Hembra	12	5,80	16	2.500	125
28	Hembra	24	6,52	22	1.100	125
29	Macho	18	5,80	20	530	170
30	Hembra	24	5,10	22	2.500	450
31	Hembra	8	5,10	22	2.400	125
32	Macho	10	5,47	16	1.500	125
33	Macho	10	6,10	45	390	160
34	Macho	24	5,31	22	2.400	450
35	Hembra	24	5,80	10	1.000	100
36	Macho	24	5,30	20	1.700	180
37	Macho	36	5,40	22	1.700	160
38	Hembra	24	5,70	10	1.700	350
39	Hembra	54	6,63	10	2.700	26
40	Hembra	108	7,15	16	1.100	90
41	Hembra	12	5,26	22	2.400	62
42	Hembra	96	6,68	27	780	160
43	Macho	12	5,80	20	1.500	160
44	Macho	12	6,31	20	1.100	62
45	Hembra	96	5,99	16	1.100	62
46	Hembra	12	5,89	20	1.100	140
47	Hembra	24	5,75	10	200	110
48	Macho	72	5,69	20	1.100	170
49	Hembra	36	6,45	32	1.700	125
50	Hembra	108	7,31	54	1.100	62
51	Macho	12	6,90	16	2.500	125

Tabla II: Población estudiada y valores obtenidos para cada parámetro.

SUBGRUPO	N° DE ANIMALES	MEDIA
Hembras jóvenes	9	5,64 ± 0,14
Hembras adultas	21	6,37 ± 0,17
Machos jóvenes	9	6,19 ± 0,18
Machos adultos	12	5,63 ± 0,14

Tabla III: Valores medios de proteínas totales (expresados en g/dl) obtenidos en los diferentes subgrupos sexo-edad.

IgA	21,45 ± 11,30
IgG	1.510,98 ± 634, 59
IgM	136,86 ± 94,60

Tabla IV: Concentración media (expresada en mg/100 ml.) de cada una de las inmunoglobulinas plasmáticas estudiadas.