

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN CANINOS INFECTADOS CON SARNA DEMODÉCICA TRATADOS CON AMITRAZ O TIMOESTIMULINA TP-1

Evaluation of the Immunological Response in Canines Infected with Demodectic Mange after Treatment with Amitraz or Thymostimulin Tp-1

Glen Barboza¹, Sergio Rivera¹, Omaira Parra¹, Gibson Fernández¹, Roger Ramírez¹ y Clara Otero²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Apartado 15252. E-mail: amena@cantv.net.

²Unidad de Diálisis y Trasplantes, Hospital Universitario de Maracaibo, Universidad del Zulia. Maracaibo 4005-A, Edo. Zulia, Venezuela.

RESUMEN

La evaluación clínica e inmunológica de diez caninos con demodicosis generalizada mostró un patrón de lesiones acorde con la sintomatología descrita para esta enfermedad, constituida en su mayoría por la presencia de zonas alopécicas, prurito y eritema difusos y en menor porcentaje, por lesiones costrosas, ronchas, foliculitis y úlceras. La edad de los pacientes se ubicó entre 5 y 24 meses pudiéndose clasificar como demodicosis de comienzo juvenil. Las razas más afectadas fueron el Pastor Alemán, el Criollo y el Chow-Chow. El 60% de los pacientes fueron machos. La mitad de los animales fueron tratados con Amitraz en 250 ppm (0,025%) y la otra mitad con Timoestimulina Tp-1 Serono. Antes del tratamiento, los valores hematológicos de los caninos infectados se detectaron en su mayoría dentro de los límites normales, pudiéndose observar en algunos, neutrofilia con desviación a la izquierda de tipo regenerativa, eosinofilia y monocitosis. Con el Amitraz se observaron algunos casos de neutrofilia y monocitosis. Leucocitosis, neutrofilia, linfocitosis y monocitosis fueron observados posterior al tratamiento con la Timoestimulina. El tratamiento con ambos medicamentos resultó efectivo entre un 75 y 100% a los 30 días. La prueba de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) resultó negativa en todos los caninos infectados. Ambos tratamientos permitieron recuperar la función neutrofílica. Los linfocitos de los pacientes estimulados con mitógenos tales como PHA (Fitoheماغlutinina) y Con A (Concanavalina A) con el Test de Transformación Linfoblástica (TTL) mostraron una baja proliferación. Comparados con los controles sanos, la supresión se ubicó en un 74,7% frente a PHA y 85,5% para Con A. El trata-

miento con Amitraz no modificó la respuesta proliferativa linfocitaria. Los animales tratados con Timoestimulina mostraron una sobre estimulación frente a ambos mitógenos. Estos resultados sugieren que los caninos con demodicosis generalizada presentan una deficiencia de la inmunidad innata y adaptativa. La recuperación de la respuesta linfocitaria por efecto de la Timoestimulina exclusivamente puede resolver el cuadro clínico de la demodicosis generalizada.

Palabras clave: Demodicosis, canino, Amitraz, Timoestimulina, mitógenos, TTL, inmunosupresión.

ABSTRACT

Clinical and immunological evaluation of ten canines affected with generalized demodicosis showed a similar lesion pattern as described for the disease, such as, alopecic areas, pruritus, and diffuse erythema and in less degree crusts lesions, excoriations, folliculitis and ulcers. Age of all patients was in the range of 5 to 24 months, allowing to classify the disease as juvenile demodicosis. The most affected breeds were german shepherd, mongrel and chow-chow. Sixty percent of the patients were males. Half of the animals was treated with Amitraz at 250 ppm. (0.025%) and the other half with Thymostimulin Tp-1 Serono. Before treatment, hematological values were found to be in normal ranges in most of the patients, some of them were found to have, neutrophilia with a regenerative left shift, eosinophilia and with a monocytosis. With the Amitraz treatment some cases of neutrophilia and monocytosis were observed. After treatment with Thymostimulin, leukocytosis, neutrophilia, lymphocytosis and monocytosis were found. Both treatments were effective at ranges from 75% to 100% after 30 days. Nitroblue tetrazolium (NBT) test was negative in all the infected

canines. Both, Amitraz and Thymostimulin treatments recovered neutrophilic function. The lymphocytes of patients stimulated with mitogens such as Phytohemagglutinin (PHA) and Concanavalin A (Con A) with the Lymphoblastic Transformation Test (LTT), showed low proliferation. When compared to healthy controls, suppression was of 74.7% with PHA and 85.5% with Con A. Treatment with Amitraz did not modify the lymphocytic response. The animals treated with Thymostimulin showed an overstimulated response of lymphocytes proliferation on the LTT compared to the rest of the mitogens. These results suggest that canines with generalized demodicosis show an innate and adaptative immunodeficiency. The recuperation of the lymphocytic response by the effect of Thymostimulin can solve the clinical appearance of generalized demodicosis.

Key words: Demodicosis, canine, Amitraz, Thymostimulin, mitogens, LTT, immunosuppression.

INTRODUCCIÓN

La demodicosis canina es una enfermedad dermatológica parasitaria e inflamatoria que se produce debido a la proliferación excesiva del ácaro *Demodex canis* [4, 13, 23], el cual se encuentra en el folículo piloso de los perros sanos [4]. Este es un huésped de la flora normal de la piel del perro, pudiéndose encontrar en las glándulas sebáceas y sudoríparas [13]. No se considera enfermedad contagiosa, la transmisión puede llevarse a cabo durante las primeras 72 horas de vida por contacto directo de los neonatos con la madre infectada durante el amamantamiento [13, 15, 23].

La patogenia de la demodicosis canina no se entiende totalmente, especialmente la forma crónica generalizada de la enfermedad [4, 13]. Se ha sugerido que pacientes con demodicosis canina generalizada presentan un defecto específico de las células T [4]. Esto permite la multiplicación del parásito y a su vez una mayor depresión de las células T [13]. Varios informes refieren una respuesta inmunitaria celular anormal, como la causa inicial de la enfermedad, ya que puede ser inducida en cachorros administrando suero antilinfocitario; los perros con demodicosis generalizada muestran respuesta de células T muy disminuida en presencia de mitógenos T, por lo tanto la inmunosupresión preexistente, considerada como el origen de la enfermedad, está correlacionada con la extensión y duración de la enfermedad y el número de parásitos [13, 21].

La inmunidad no específica en la demodicosis canina ha sido estudiada solo desde el punto de vista de los neutrófilos, la deficiencia no absoluta de neutrófilos o anomalías en la morfología en éstos no ha sido observada [23]. Los perros con demodicosis crónica tienen una severa depresión de las funciones de las células T, medida por el test de transformación linfoblástica (TTL) frente a varios mitógenos (Fitohemaglutinina y Concanavalina A). Como estos perros raramente presentan

linfopenia y no tienen hipocelularidad de células T de áreas de nódulos linfáticos y bazo, estos defectos en las células T parecerían más una supresión que una deficiencia [23]. La erradicación terapéutica de estos ácaros resulta en la restauración de la función de las células T. Este defecto de las células T previamente demostrado se encuentra asociado con grandes poblaciones de ácaros [15, 23].

La demodicosis localizada aparece como una o más áreas pequeñas, circunscritas, eritematosas, escamosas, no pruríticas o pruríticas, alopecias, más comúnmente en la cara y en los miembros anteriores. Los animales jóvenes de 6 a 9 meses de edad con demodicosis localizada pueden curar de forma espontánea entre 6 y 8 semanas [13, 23].

La demodicosis generalizada cubre grandes partes del cuerpo, en especial la cabeza y las patas [23]. Otros estudios reportan alopecia multifocal o difusa, eritema, edema, costras, descamación, comedones, piodermas, furunculosis, liquenificación, y linfadenopatías [13].

Los raspados profundos de piel debidamente realizados e interpretados, pueden establecer el diagnóstico de la demodicosis por la demostración del ácaro. Un ácaro ocasional puede representar la flora normal, por lo que la observación de numerosos ácaros adultos o formas inmaduras del ciclo de vida son necesarios para confirmar el diagnóstico [15, 23].

En la actualidad existen varias opciones de tratamiento antiparasitario específico, aunque el Amitraz es el único fármaco disponible en el mercado a escala mundial para el tratamiento de la Demodicosis canina [13]. El Amitraz es el único producto licenciado en los Estados Unidos y Canadá para el tratamiento de la Demodicosis generalizada [4, 23]. La droga es un pesticida formamida con actividad farmacológica que incluye, inhibición de la monoamino oxidasa, del agonista alfa 2 adrenérgico de la síntesis de las prostaglandinas [13, 20, 22]. Esta solución (Amitraz) está aprobada para ser aplicada cada día a una dilución final de 250 ppm (0,025%) [4, 15, 16, 17, 20, 22, 24].

Como una terapéutica alternativa cuando falla el Amitraz, está la administración de la Ivermectina, utilizada semanalmente en perros con Demodicosis generalizada crónica con resultados desalentadores [23].

La Milbemicina ha sido evaluada en varios estudios para el tratamiento de la Demodicosis, con una dosis total diaria que variaba de 0,5 mg/kg a 4,6 mg/kg [4].

El uso de la timoestimulina en caninos con demodicosis no ha sido reportado. La timoestimulina se aisló y purificó en 1977. Extraída del timo bovino, está constituida por una familia de polipéptidos con peso molecular inferior a 12.000. La timoestimulina con dosis de hasta 500 mg/kg por día intravenoso, no ha producido modificaciones del comportamiento normal de los animales sometidos a experimentación. En las pruebas reportadas en ratas y topes, la Timoestimulina no ha provocado ninguna muerte de los animales sujetos al experi-

mento. Las curvas de crecimiento ponderal y el peso de los principales órganos han resultado equiparables entre los animales tratados y el control. No se han observado modificaciones de los principales parámetros hematoquímicos ni alteraciones histológicas de los órganos examinados. Estos mismos resultados han sido obtenidos en grupos de animales tratados durante un período de 180 días con dosis de hasta 50/mg/kg/día [9].

In vitro, la Timoestimulina estimula la respuesta de los linfocitos T a los mitógenos, es decir, su capacidad de proliferar en presencia de sustancias como la concanavalina A y la fitohemaglutinina; la especificidad de la acción del fármaco está demostrada por el hecho de que con ninguna dosificación aumenta la reactividad celular al lipopolisacárido (LPS), mitógeno de los linfocitos B [11].

En niños con deficiencias de linfocitos T tratados con Timoestimulina a la dosis de 1 mg/kg/día durante 7 días consecutivos y después 1 mg/kg/día una o dos veces por semana la mejoría del cuadro inmunológico correspondía con frecuencia a una mejoría clínica [1]. Otros estudios reportados para las diferentes formas de inmunodeficiencia en humanos, utilizando el mismo esquema terapéutico, confirman los resultados obtenidos [1, 6, 12, 26]. Patologías consecuencia del compromiso de la respuesta celular tales como infecciones virales debidas a virus Herpes, patologías neoplásicas [14] y Sarcoidosis [25] han sido tratadas con éxito con esta hormona.

En este estudio, basado en los antecedentes de la fisiopatología de la demodicosis, se propone evaluar la respuesta inmune innata y específica *in vitro* de caninos con demodicosis generalizada, antes y después del tratamiento con Amitraz y Timoestimulina separadamente, comparándola con la evolución de los parámetros clínicos de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de las unidades de estudio

Estuvieron conformadas por diez caninos jóvenes, entre 5 y 24 meses de edad, de diferentes razas (Criolla, Pastor Alemán, Chow-Chow y Boxer), infectados naturalmente con sarna demodéctica generalizada, seleccionados al azar, que se recibieron en el Servicio de Consulta Externa de Pequeños Animales de la Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia. Para su diagnóstico se realizó un frotis de raspados profundos de piel, los cuales fueron observados directamente al microscopio de luz, evidenciándose el *Demodex canis* en sus múltiples estadios evolutivos. Las lesiones de piel se ubicaron en varias zonas del cuerpo, como patas, cara, cuello, dorso, tren posterior y región abdominal, lo cual confirmó el diagnóstico de sarna demodéctica generalizada. Estos pacientes presentaron, además, prurito, foliculitis, úlceras y costros.

Características de los controles

Los controles fueron seleccionados al azar entre pacientes sanos que asistieron a consulta para controles de rutina, libres de sarna demodéctica, no mayores de 2 años de edad y de diferentes razas.

Protocolo del tratamiento

El estudio fue conducido utilizando dos tratamientos, donde 5 caninos fueron tratados con Amitraz y otros 5 fueron tratados con Timoestimulina (Tp-1) Serono en estudios separados.

Amitraz: Se utilizó una solución de Amitraz de 250 ppm (0,025%), es decir, 50 mL de Amitraz al 5% diluidos en 10 litros de agua. Con esta solución final se realizaron baños profundos cada 7 días durante cuatro semanas a cada paciente. La solución fue preparada al momento de aplicarla con masajes fuertes sobre la piel durante 15 minutos, dejándolos secar luego al aire libre. Estos tratamientos fueron aplicados en el área de hospitalización de la Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia.

Timoestimulina (Principio activo de Tp-1 Serono): Para este estudio se utilizó una dosis de 2mg/kg de peso vivo, administrada vía intramuscular una vez al día por 7 días y luego dos veces por semana durante 3 semanas más, completando cuatro semanas de tratamiento.

Todos los pacientes se monitorearon clínica, hematológica e inmunológicamente, antes, durante y al finalizar el tratamiento.

Evaluación clínica

A los pacientes se les practicó un examen clínico, en el cual se consideraron los parámetros de todos los sistemas, se registró esta información en una historia clínica y además, toda la información referente a piel y anexos fue registrada en una historia clínica dermatológica. La evaluación clínica consistió en examen físico completo, observación de las lesiones dermatológicas y raspados cutáneos profundos para observación microscópica del parásito.

Evaluación hematológica

Durante esta evaluación se realizó una hematología completa, la cual incluyó hematocrito, hemotrópicos, conteo de glóbulos blancos y fórmula leucocitaria.

Estudio de la inmunidad innata

Se evaluó el funcionamiento de los neutrófilos en los controles y en los pacientes con sarna demodéctica antes y después del tratamiento, utilizando un kit para medir la reducción del Nitro Blue de Tetrazolium (NBT, Sigma Diagnostic, Procedimiento N° 840) [5].

Evaluación de la respuesta celular

Test de Transformación Linfoblástica (TTL): La respuesta linfocitaria *in vitro* se evaluó mediante el Test de Transformación Linfoblástica (TTL) previamente descrito [19]. Después de calculadas las curvas de dosis respuesta con los animales controles, se establecieron las dosis de mitógenos de la manera siguiente: Fitohemaglutinina (PHA) 10 µg/mL y Concanavalina A (Con A) 10 µg/mL. En cada ensayo se incluyeron por lo menos tres controles sanos. Los resultados obtenidos en cuentas por min (cpm) fueron expresados como Índice de Estimulación (IE) e Índice de Respuesta Proliferativa (IRP), resultado de la aplicación de las fórmulas siguientes:

$$IE = \text{cpm}^n \text{ experimento} / \text{cpm}^n \text{ espontáneo}$$

$$IRP = \text{cpm}^n \text{ (paciente)} / \text{cpm}^n \text{ (promedio de 3 controles)}$$

Análisis de la información

Los resultados de la evaluación clínica se expresan en números y porcentajes los cuales se presentan en tablas para cada caso.

Los resultados del TTL se evaluaron según el análisis estadístico de ANOVA mediante START MLAPHICS [8].

RESULTADOS

Evaluación clínica

Con relación a la sintomatología observada en los pacientes estudiados se tiene que el 100% presentó zonas alopécicas y semialopécicas, el 70% prurito y eritema difuso y en menor porcentaje, se observaron lesiones costrosas, ronchas, foliculitis y úlceras.

El rango de edad de los pacientes se situó entre 5 y 24 meses. La mayoría (60%) se ubicó entre 8 y 12 meses de edad.

La raza mayormente afectada dentro del grupo de pacientes estudiados fue el Pastor Alemán con un 40%, seguido de la raza Criolla con un 30%.

La población estudiada estuvo conformada por un 60% de machos y 40% de hembras.

Sobre la base de los indicadores hematológicos de los caninos tratados con Amitraz se observó que todos presentaron valores normales a excepción de un caso (canino 5), el cual presentó un ligero aumento de los neutrófilos en bandas antes del tratamiento; después del tratamiento se observaron algunos casos de neutrofilia y monocitosis, TABLA I.

De acuerdo a la eficacia del tratamiento con Amitraz en los caninos estudiados con Demodicosis generalizada, se observó a los 15 días una curación clínica entre el 35 y 60% y, entre 75 y 100% a los 30 días del tratamiento.

En relación con los pacientes tratados con Timoestimulina, se pudo apreciar que antes del tratamiento se encontraron dos perros que presentaron neutrofilia con desviación a la izquierda de tipo regenerativa, pudiéndose también observar una eosinofilia y monocitosis en otros pacientes. Después del tratamiento se observó un caso con leucocitosis, neutrofilia y desviación a la izquierda; también se pudo observar en otros pacientes linfocitosis y monocitosis marcada, TABLA II.

En relación con el tratamiento con Timoestimulina Tp-1, la eficacia observada a los 15 días se ubicó entre el 15 y 60%. A los 30 días se observó una curación clínica entre 60 y 100%.

Los controles mostraron un rango de actividad de los neutrófilos en la prueba de NBT de 1 a 2% sin estimulación pasando a un intervalo de 5 a 9% posterior a la estimulación.

TABLA I

INDICADORES HEMATOLÓGICOS DE LOS CANINOS TRATADOS CON AMITRAZ ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

| Indicadores Hematológicos | Nº de casos | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|--------|--------|-------|--------|-------------------------|--------|-------|-------|-------|
| | Antes del tratamiento | | | | | Después del tratamiento | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Hematocrito % | 39 | 38 | 40 | 42 | 44 | 48 | 43 | 45 | 44 | 42 |
| Hemoglobina g % | 11,88 | 11,16 | 13,4 | 14 | 13,2 | 15,8 | 14,3 | 14,7 | 14,4 | 12,6 |
| Contaje | | | | | | | | | | |
| Glóbulos B./UL. | 9.700 | 12.350 | 11.900 | 8.000 | 14.000 | 12.400 | 12.300 | 7.400 | 6.600 | 9.800 |
| Linfocitos % | 15 | 13 | 18 | 17 | 13 | 4 | 20 | 12 | 26 | 20 |
| Juveniles % | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| N. Bandas % | — | — | — | 2 | 8 | 4 | 2 | — | 6 | — |
| N. Segmentados % | 77 | 62 | 73 | 67 | 65 | 81 | 72 | 69 | 64 | 71 |
| Eosinófilos % | 3 | 14 | 3 | 5 | 2 | 1 | — | 6 | 3 | 3 |
| Monocitos % | 5 | 9 | 6 | 9 | 12 | 10 | 6 | 17 | 3 | 6 |

TABLA II
INDICADORES HEMATOLÓGICOS DE LOS CANINOS TRATADOS CON TIMOESTIMULINA TP-1
ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

| Indicadores Hematológicos | Nº de casos | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|-------|--------|--------|--------|-------------------------|--------|--------|-------|-------|
| | Antes del tratamiento | | | | | Después del tratamiento | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Hematocrito % | 38 | 39 | 30 | 32 | 36 | 29 | 38 | 35 | 33 | 29 |
| Hemoglobina g % | 11,4 | 12,9 | 10,2 | 11 | 10,8 | 10,6 | 13,3 | 7,5 | 9,9 | 8,7 |
| Contaje | | | | | | | | | | |
| Glóbulos B./UL. | 10,000 | 6,800 | 13,800 | 14,150 | 14,250 | 8,650 | 17,500 | 18,750 | 9,500 | 4,300 |
| Linfocitos % | 25 | 19 | 11 | 3 | 13 | 39 | 8 | 13 | 18 | 25 |
| Juveniles % | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| N. Bandas % | — | — | 26 | 19 | 1 | — | — | 12 | 3 | — |
| N. Segmentados % | 52 | 65 | 53 | 61 | 71 | 47 | 81 | 47 | 55 | 44 |
| Eosinófilos % | 14 | 11 | 4 | 1 | 2 | — | 3 | 8 | 8 | — |
| Monocitos % | 9 | 5 | 6 | 16 | 13 | 14 | 8 | 11 | 16 | 31 |

TABLA III
RESPUESTA DE LA INMUNIDAD NO ESPECÍFICA DE LOS NEUTRÓFILOS MEDIDA POR EL NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT) DE LOS PACIENTES CANINOS TRATADOS CON AMITRAZ, ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

| NBT % | Nº de casos | | | | | | | | | |
|---------------|-----------------------|----|----|----|----|-------------------------|----|-----|----|-----|
| | Antes del tratamiento | | | | | Después del tratamiento | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Sin Estimular | 0% | 0% | 0% | 1% | 0% | 4% | 1% | 5% | 2% | 1% |
| Estimulado | 0% | 0% | 0% | 1% | 0% | 20% | 8% | 16% | 7% | 8%* |

* Diferencia significativa $P < 0,001$.

TABLA IV
RESPUESTA DE LA INMUNIDAD NO ESPECÍFICA DE LOS NEUTRÓFILOS MEDIDA POR EL NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT) DE LOS PACIENTES CANINOS TRATADOS CON TIMOESTIMULINA, ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

| NBT % | Nº de casos | | | | | | | | | |
|---------------|-----------------------|----|----|----|----|-------------------------|----|----|----|----|
| | Antes del tratamiento | | | | | Después del tratamiento | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Sin Estimular | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 2% | 0% | 0% | 1% | 0% |
| Estimulado | 11% | 4% | 1% | 5% | 0% | 4% | 3% | 0% | 3% | 0% |

El tratamiento con Amitraz aumentó significativamente ($P < 0,001$) la actividad de los neutrófilos medida por el NBT. Los animales infectados, no tratados mostraron rangos de 0 a 1% con y sin estimulación. Posterior al tratamiento, el rango sin estimulación fue de 1 a 4% alcanzando valores post estimulación de 7 a 20%, TABLA III.

Posterior al tratamiento con Timoestimulina, se observó preferiblemente una normalización del porcentaje de estimulación de neutrófilos. Los caninos infectados de este grupo, mostraron valores sin estimulación de 0% alcanzando cifras en un rango de 0 a 11% posterior a la estimulación. Luego del tratamiento se observaron valores de 0 a 2% sin estimulación pasando a cifras de 0 a 4% post estimulación las cuales se si-

túan dentro de los valores obtenidos en los controles, TABLA IV.

La curva dosis respuesta de los controles para el Test de Transformación Linfoblástica (TTL) permitió establecer la dosis óptima de mitógenos de la manera siguiente: PHA 10 $\mu\text{g/mL}$, FIG. 1, y ConA 10 $\mu\text{g/mL}$, FIG. 2. Los c.p.m. promedio para PHA se ubicaron en 2239 ± 129 y para ConA en 6059 ± 727 .

En el grupo de caninos infectados, el índice de respuesta proliferativa (IRP) linfocitaria medido frente a los mitógenos PHA y ConA antes del tratamiento, resultó significativamente inferior al de los controles ($P < 0,05$). Frente a la PHA se obtuvo

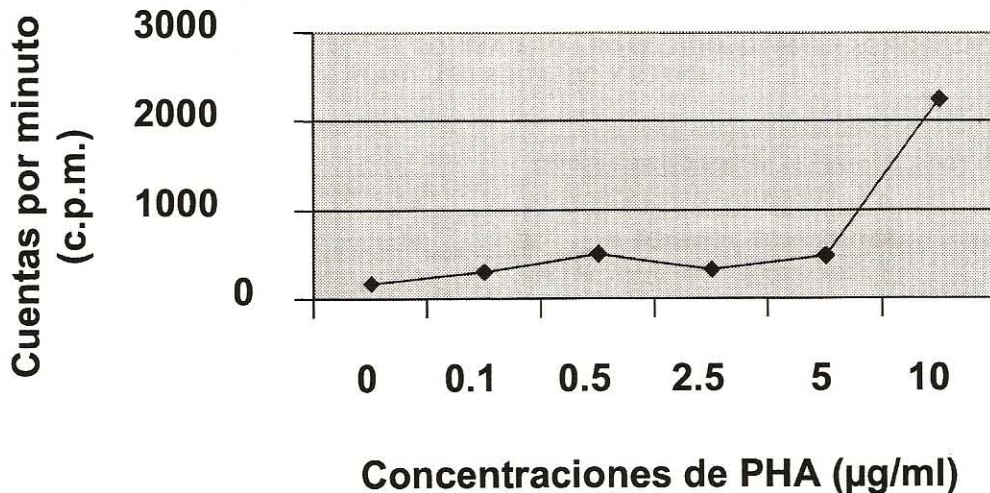


FIGURA 1. CURVA DOSIS RESPUESTA DE ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS CANINOS CON PHA.

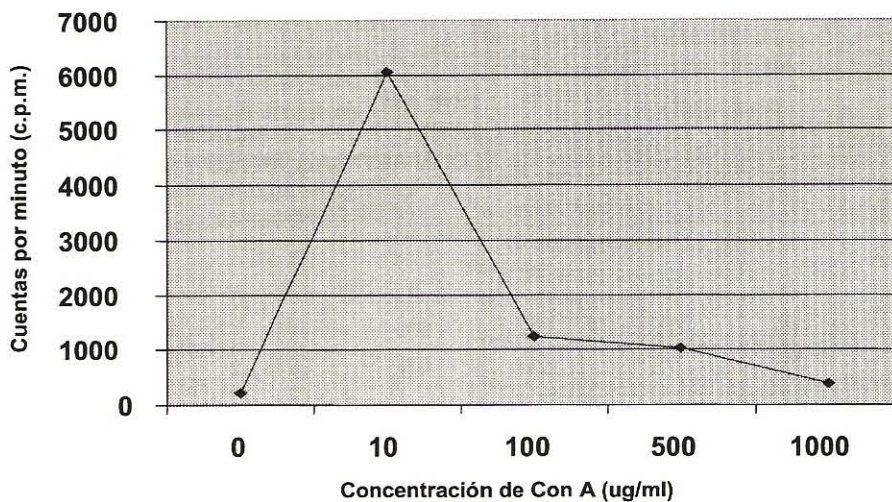


FIGURA 2. CURVA DOSIS RESPUESTA DE ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS CANINOS CON Con A.

un IRP= 0,23 y un IRP= 0,14 para la ConA. El porcentaje de supresión se ubicó en un 74,7% para PHA y 85,5 para ConA, TABLA V.

El IRP de los linfocitos de caninos infectados frente a PHA y ConA después del tratamiento con Amitraz no mostró variación significativa (IRP PHA=0,1, IRP ConA=0,14), TABLA VI.

El tratamiento con Timoestimulina incrementó sustancialmente los índices de estimulación frente a la PHA y ConA, FIG. 3. Los IRP postratamiento se ubicaron en 1,75 para PHA y 1,03 para ConA. La diferencia obtenida con ambos mitógenos fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$), TABLA VI.

DISCUSIÓN

La sintomatología predominante en los animales con demodicosis canina fue la alopecia/semi-alopecia seguida del eritema difuso. Estos síntomas coinciden con los descritos previamente para la enfermedad [13].

La Demodicosis generalizada ha sido sub-clasificada en Demodicosis de comienzo juvenil y adulto (después de los 2 años) [7, 13]. En este estudio se pudo observar en su mayoría caninos con edades comprendidas entre 5 meses y un año, por lo cual los pacientes entran en la sub-clasificación de Demodicosis de comienzo juvenil. Sólo un caso se presentó en un canino con edad de 24 meses, siendo aún clasificable como Demodicosis de comienzo juvenil según ha sido descrito en otros estudios [15].

La raza más afectada en este estudio fue la Pastor Alemán seguida de la Criolla y Chow Chow. Las mismas no aparecen reportadas en la literatura con predisposición a la enfermedad [15, 23]. Un estudio más amplio podría revelar cifras diferentes aun cuando las razas de caninos reportadas como predispuestas a la enfermedad no se encuentran frecuentemente en nuestro medio.

Un número mayor de machos que de hembras fueron afectadas. En otro estudio se observó un número mayor de hembras que de machos [7].

TABLA V
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE CANINOS SANOS Y CON DEMODICOSIS GENERALIZADA FRENTE A LOS MITÓGENOS PHA y ConA.

| Mitógenos | IE* Controles sanos | IE Demodicosis | IRP** | % Supresión |
|------------------|---------------------|----------------|-------|-------------|
| PHA (10 µg/mL) | 12,5 | 2,9 | 0,23 | 74,7% |
| Con A (10 µg/mL) | 26,41 | 3,82 | 0,14 | 85,5% |

*Índice de estimulación. **Índice de respuesta proliferativa.

TABLA VI
ÍNDICE DE RESPUESTA PROLIFERATIVA (IRP) PROMEDIO DE LINFOCITOS DE CANINOS CON DEMODICOSIS GENERALIZADA, ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON AMITRAZ O TIMOESTIMULINA

| Mitógeno | Pre Tratamiento | Post Tratamiento Amitraz | Post Tratamiento Timoestimulina |
|----------|-----------------|--------------------------|---------------------------------|
| PHA | 0,23 | 0,1 | 1,75* |
| Con A | 0,14 | 0,14 | 1,03* |

* Diferencia significativa $P < 0,05$.

Los animales infectados presentaron hematocrito y hemoglobina con valores ligeramente por debajo de los normales, el conteo de glóbulos blancos se encontró dentro de los parámetros normales, se observó una ligera disminución del % de linfocitos. El porcentaje de los segmentados no presentó variación con respecto a las cifras normales, sin embargo algunos de estos pacientes mostraron aumento de los neutrófilos en banda probablemente asociado a una pioderma secundaria. Se observó eosinofilia en la mitad de los casos y el resto mostró valores normales, lo cual coincide con lo descrito en la literatura asociado a dermatopatías [23]. Se observó monocitosis en la mayoría de los casos, la cual se observa frecuentemente en enfermedades de curso crónico [18].

En líneas generales, los resultados hematológicos se mantuvieron posterior al tratamiento con Amitraz, sobre todo en lo referente a los valores de hematocrito, hemoglobina y % de linfocitos. El conteo de glóbulos blancos se mantuvo en su mayoría dentro de los límites normales, al igual que los segmentados. Los eosinófilos disminuyeron, manteniéndose dentro de los límites normales. La monocitosis se mantuvo o incrementó en la mayoría de los casos.

En los pacientes tratados con Timoestimulina (Tp-1) los valores hematológicos no presentaron variación relevante después del tratamiento, sin embargo se pudo observar que los caninos que habían presentado eosinofilia tuvieron disminución de éstos. También se observó un incremento de los monocitos en todos los pacientes.

Ambos tratamientos mostraron un elevado porcentaje de curación. Sin embargo, con la Timoestimulina se observaron cifras de recuperación mejores a los 30 días post tratamiento.

Los animales infectados mostraron una baja estimulación de neutrófilos medida por el NBT.

El Amitraz logró reponer significativamente la función neutrófila en la mayoría de los pacientes lo cual podría estar

relacionado con la eliminación directa del parásito concomitantemente con la disminución de detritos celulares e infecciones de gérmenes oportunistas capaces de bloquear la función fagocítica del neutrófilo. La mayoría de los autores no reportan alteraciones en la función de los neutrófilos en caninos infectados con el *Demodex canis* [23]. Este resultado, de ser confirmado, indicaría que la inmunidad innata pudiera también estar comprometida en la demodicosis canina.

El tratamiento con Timoestimulina no modificó sustancialmente este parámetro. Este fármaco actúa específicamente sobre la respuesta de los linfocitos T y no sobre otras poblaciones celulares, según lo reportado en las pruebas "in vitro". Sin embargo, se observó una normalización de la actividad de los neutrófilos posterior al tratamiento probablemente relacionada con la desaparición del parásito [10].

Todos los animales infectados mostraron una disminución significativa del IRP en el TTL en comparación con los controles frente a los mitógenos PHA y ConA. Esta disminución de la respuesta proliferativa linfocitaria frente a los mitógenos ha sido previamente reportada, relacionada principalmente a un defecto de la función de los linfocitos T y no a un cuadro de hipocelularidad en estas células [23].

Sólo el tratamiento con la Timoestimulina logró recuperar la respuesta linfocitaria proliferativa, mostrando en el caso de la PHA, inclusive una sobre estimulación. Estos resultados confirman las observaciones previas reportadas en la literatura, en las cuales se evidencia el estado de supresión linfocitaria T producto de la infección con el *Demodex canis* [2, 3] y tienden a demostrar que la recuperación de la respuesta celular producto de la estimulación con hormonas tímicas es suficiente para resolver el cuadro de Demodicosis canina.

En los animales tratados con Amitraz no se observaron diferencias entre los IRP pre y post tratamiento a pesar de la eliminación del parásito, el seguimiento a mayor largo plazo de estos animales pudiera arrojar información sobre la evolución