

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias

**Dermatosis inmunomediadas en caninos: diagnóstico clínico,  
histopatológico e inmunohistoquímico**

Autora: Med. Vet. Sieben, Cintia

Directora: Dra. Massone, Adriana R

Codirectora: Dra. Machuca Mariana A

Lugar de trabajo: Laboratorio de patología Especial Veterinaria Dr. B  
Epstein. Hospital Escuela, Consultorio Dermatológico. FCV. UNLP

Miembros del jurado:

Dra. Corrada, Yanina A

Dra. Rambeaud, Magdalena

Dra. Mundo, Silvia L

**2021**

## **Agradecimientos**

A mis padres y hermano, María Luisa, Juan Andrés y Sebastián por brindarme la posibilidad de estudiar y acompañarme en cada paso que doy, manifestando siempre su apoyo y cariño.

A mi marido e hijo, Martín y Constantino, por estar siempre de forma incondicional.

A mi tía Patricia, por ser segunda madre y a mi primo, Mariano, por responder mis inquietudes estadísticas.

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Veterinarias por formarme académicamente y brindarme los medios económicos para el desarrollo de la tesis doctoral.

A mi directora, Adriana R. Massone y co-directora Mariana A. Machuca, por guiarme y acompañarme durante todos estos años. A vos Mariana, por ser docente, madre, concejera, marcarme el paso y siempre estar presente.

A todo el Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. B. Epstein, por brindarme un lugar físico para desarrollar mi trabajo. A María Alejandra Quiroga por brindarme su tiempo. A Carolina Aralda, Oscar Cáceres y Cecilio Castro por procesar el material, ayudarme en la búsqueda y brindarme amenos momentos en el Laboratorio. A Nicolas Streitenberger y Gonzalo Madariaga por responder siempre a mis dudas.

Al Hospital de la Facultad de Ciencias Veterinarias por ser parte de mi formación profesional.

A Guillermo Broglia por ser mi mentor en la dermatología, por leer mis escritos y estar presente.

A Carolina Zanuzzi, Fabian Nishida, Enrique Portiansky por brindarme su ayuda desinteresada en las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia y en el procesamiento de las imágenes.

A Andrea Pachamé por brindarme charlas y su conocimiento.

Al Laboratorio de inmunoparasitología y a Gastón Moré por ayudarme en la técnica de inmunofluorescencia y por dejarme utilizar las instalaciones y el microscopio de fluorescencia.

## **Financiamiento**

- **Beca de la UNLP**

Beca de Investigación TIPO A. Fecha de inicio: abril 2014-Fecha de finalización: abril 2017. Institución Otorgante: Universidad Nacional de La Plata. Resolución N°: 482/14. Tema: Dermatitis Inmunomediadas en caninos: diagnóstico clínico, histopatológico e inmunohistoquímico.

Directora: Dra. Massone, Adriana y Co-directora: Dra. Machuca, Mariana.

Beca de Investigación TIPO B. Fecha de inicio: abril 2017-Fecha de finalización: abril 2019. Institución Otorgante: Universidad Nacional de La Plata. Resolución N°: 774/16. Tema: Dermatitis Inmunomediadas en caninos: diagnóstico clínico, histopatológico e inmunohistoquímico.

Directora: Dra. Massone, Adriana y Co-directora: Dra. Machuca, Mariana.

- **Laboratorio de Patología Especial**

### **Subsidios de los proyectos:**

\*Proyecto de Incentivos para docentes-investigadores de la UNLP. "Estudios clínicos, anatomopatológicos, histoquímicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular en procesos inflamatorios y neoplásicos de animales de compañía". Directora: Adriana Raquel Massone, Codirectora: Mariana Alejandra Machuca. Periodo de ejecución: 01/01/2015 al 31/12/2016. Código: 11 V/234.

\*Proyecto de Incentivos para docentes-investigadores de la UNLP. "Procesos inflamatorios y neoplásicos en animales de compañía: estudios

anatomopatológicos, histoquímicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular aplicados a biopsias y biopsias endoscópicas”. Pertenece al programa de incentivos docentes-investigadores de la UNLP. Directora: Adriana Raquel Massone, Codirectora: Mariana Alejandra Machuca. Periodo de ejecución: 01/01/2017 al 31/12/2018. Código: 11 V/252.

## **Citas de publicaciones parciales del trabajo de tesis**

### **Publicaciones en congresos**

- Sieben C, Broglia G, Machuca M, Massone A. Diagnóstico anatomopatológico y por inmunofluorescencia directa en un caso de pénfigo vulgar canino. XVº Congreso Nacional AVEACA. 2015. CABA – Buenos Aires.
  
- Sieben C, Broglia G, Massone AR, Machuca MA. Dermatitis autoinmunes en caninos. Estudio retrospectivo. XIº Reunión Argentina de Patología Veterinaria. 2018. FCV UNLP – La Plata
  
- Sieben C, Broglia G, Massone AR, Machuca MA. Inmunohistoquímica aplicada al diagnóstico del complejo pénfigo y lupus eritematoso discoide en caninos. XIº Reunión Argentina de Patología Veterinaria. 2018. FCV UNLP – La Plata
  
- Streitenberger N, Sieben C, Muriel M, Machuca MA, Aguirre MB, Quiroga MA. Dermatitis autoinmune compatible con penfigoide bulloso en un equino. XIº Reunión Argentina de Patología Veterinaria. 2018. FCV UNLP – La Plata

## Publicaciones en revistas científicas

- Sieben C, Massone A, Broglia G, Machuca M. Actualización en dermatosis autoinmunes en caninos caracterizadas por las lesiones primarias pústulas, vesículas y ampollas: anatomopatología y diagnóstico. Publicado en la Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP). Volumen 30, Número 1 (2019). <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/articulo/view/15778>
- Sieben C, Massone A, Machuca M. Dermatitis autoinmunes en caninos: estudio retrospectivo. (2004-2016). Aceptado para su publicación en la Revista Veterinaria. FCV UNNE. Rev. Vet. 30: 1, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.30972/vet.3013916>

## INDICE DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
Lista de abreviaturas	8
Resumen	12
Summary	13
Introducción general	14
Hipótesis de trabajo y objetivos generales	66
Estudio retrospectivo	67
Objetivos	67
Estudio anatomopatológico	68
Estudio inmunohistoquímico	69
Estudio Lectinhistoquímico	71
Estudio prospectivo	74
Objetivos	74
Estudio clínico	75
Estudio inmunohistoquímico	78
Técnica de inmunofluorescencia	78
Resultados	81
Discusión	119
Conclusión	130
Proyecciones	132
Anexo I	133
Anexo II	135
Anexo III	137
Anexo IV	139
Anexo V	141
Anexo VI	143
Anexo VII	145
Bibliografía	150

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Acido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
ANA	Anticuerpos antinucleares
BPAG 2/BP180	Antígeno penfigoide bulloso tipo 2
BPAG1/BP230	Antígeno penfigoide bulloso tipo 1
CD	Citotóxico
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
Con A	Concavalina ensiformes
CP	Complejo pénfigo
DAB	Diaminobencidina
DAPI	4´6-diamidino-2-dihidrocloruro fenilindol
DBA	Dolichos biflorus
D-E	Dermo-epidérmica
DI	Dermatosis inmunomediadas
DP	Desmoplaquina
Dsc	Desmocolina
Dsg	Desmogleína
EAL	Enfermedad inmunoglobulina A lineal
EASA	Enfermedades ampollares subepidérmicas autoinmunes
EBA	Epidermólisis bullosa adquirida
EAI	Enfermedad autoinmune inespecífica
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EP	Enveloplaquina
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fragmento cristizable
HP	Histopatología
IF	Inmunofluorescencia
IFD	Inmunofluorescencia directa

IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IF-P	Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina
Ig	Inmunoglobulinas
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
LAD-1	Segmento extracelular del colágeno tipo XVII
LE	Lupus eritematoso
LEC	Lupus eritematoso cutáneo
LECE	Lupus eritematoso cutáneo exfoliativo
LED	Lupus eritematoso discoide
LEMC	Lupus eritematoso mucocutáneo
LES	Lupus eritematoso sistémico
LESA 1	Lupus eritematoso sistémico ampollar tipo 1
LEVC	Lupus eritematoso vesicular cutáneo
Lf B	Linfocito B
Lf T	Linfocito T
LHQ	Lectinhistoquímica
NC16A	Sección extracelular del colágeno XVII
NK	Natural killer
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PB	Penfigoide bulloso
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Pénfigo eritematoso
PF	Pénfigo foliáceo
Pfi	Placofilina
PG	Placoglobina
PMM	Penfigoide de las membranas mucosas
PN	Piel normal
PNA	Arachis hypogaea
PP	Periplaquina

PPN	Pénfigo paraneoplásico
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PV	Pénfigo vulgar
RCA	Ricinus communis
SBA	Glycine max
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
UEA I	Ulex europaeus I
WGA	Triticum vulgare

## **PALABRAS CLAVES**

Enfermedades autoimmune, piel, histopatología, inmunohistoquímica, caninos.

## **RESUMEN**

Las dermatosis autoinmunes se dividen en tres grupos: complejo péufigo, enfermedades ampollares subepidérmicas autoinmunes y lupus. Como objetivo se establecieron bases clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas para el diagnóstico. Se realizó un estudio retrospectivo (n=74) y prospectivo (n=19). Se consideraron las lesiones macroscópicas, las lesiones microscópicas y la aplicación de las técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y lectinhistoquímica. Se observaron diferencias significativas en el complejo péufigo con relación a la localización (periorbital y pabellones auriculares), la raza y la presencia de pústulas y acantólisis. En el lupus se observó degeneración vacuolar de células basales y en las enfermedades ampollares separación dermoepidérmica. En la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica se obtuvo un 77,03% de inmunomarcación. En el 21,05% de los casos estudiados se pudo, mediante esta técnica, complementar el diagnóstico histopatológico. Las enfermedades autoinmunes deben ser tenidas en cuenta en pacientes que presentan pústulas, vesículas, bullas y, más frecuentemente, costras, erosiones y úlceras en el dorso de la nariz, la zona periocular y los pabellones auriculares. La histopatología es útil en el diagnóstico de estas enfermedades y, en nuestro medio, sigue siendo la herramienta más utilizada para arribar a un diagnóstico definitivo.

## **KEY WORDS**

Autoimmune diseases, skin, histopathology, immunohistochemical, canine.

## **SUMMARY**

Autoimmune dermatoses are: the pemphigus complex, the autoimmune subepidermal bullous diseases and lupus. The aim was to establish clinical, histopathological and immunohistochemical bases for the diagnosis. A retrospective (n=74) and prospective (n=19) study was made. In these studies, the macroscopic and the microscopic lesions and of immunohistochemical, immunofluorescence and lectin histochemical techniques were considered. Significant differences were observed in the pemphigus complex related to the location (periorbital or auricle), the breed and the presence of pustules and acantolysis. Regarded to lupus, vacuolar degeneration of basal cells as well as dermoepidermal separation in blistering diseases were observed. In the application of the immunohistochemical technique, 77.03% immunostaining was obtained. In 21.05% of the cases studied, it was possible, through this technique, to complement the histopathological diagnosis. Autoimmune diseases should be taken into account of those patients with skin lesions such as pustules, vesicles, bullae, or, more frequently, with scabs, erosions and ulcers in areas such as the back of the nose, the periocular area, the ears. Histopathological studies are useful methods for the diagnosis and concluding with a definitive diagnosis in this type of disease.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **Generalidades**

#### **Estructura y funciones de la piel**

- Epidermis
- Unión dermo-epidérmica
- Dermis
- Hipodermis

#### **La piel y su rol en la inmunidad**

#### **Dermatosis de origen inmune**

#### **Complejo pénfigo**

- Diferentes tipos
- Diagnóstico

#### **Enfermedades ampollares subepidérmicas autoinmunes**

- Diferentes tipos
- Diagnóstico

#### **Lupus eritematoso**

- Diferentes tipos
- Diagnóstico

## **Generalidades**

El tegumento está integrado por la piel, la hipodermis y los anexos cutáneos: folículos pilosos y pelos, vibrisas, glándulas sudoríparas, merocrinas y apocrinas, glándulas sebáceas y otras estructuras que aparecen solo en algunas especies como astas, garras, uñas, pezuñas, cascos, etc. La piel estructuralmente está formada externamente por la epidermis que es la capa epitelial y a continuación la dermis que es tejido conectivo que contiene los anexos. Luego tenemos una capa subyacente de tejido conectivo más laxo que es el tejido celular subcutáneo o hipodermis (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016; Krmpotic y col., en prensa).

La piel es límite anatómico entre el cuerpo y el medioambiente. La superficie de la piel está en contacto constante con irritantes ambientales, contaminantes y diferentes patógenos. A diferencia de las enfermedades en los órganos internos, las lesiones en la piel son fácilmente visibles y, por lo tanto, son una de las razones más comunes en la consulta veterinaria. Las enfermedades de la piel varían desde problemas estéticos menores hasta condiciones que pueden amenazar la vida del paciente.

La capacidad protectora de la piel es compleja y gran parte de esta función es proporcionada por el estrato córneo. Esta capa, compuesta por queratina, mantiene la hidratación del cuerpo al restringir la pérdida de agua. Además, la constante descamación y rápida renovación celular, contribuyen a la eliminación de patógenos en la superficie. En el estrato corneo hay además péptidos antimicrobianos ( $\beta$ -defensinas, catelicidinas)

y una variedad de lípidos que también ayudan en la defensa frente a bacterias y sustancias químicas. El sistema inmune de la piel proporciona una constante inmunovigilancia que consiste en interacciones orquestadas entre las células de Langerhans, queratinocitos, linfocitos y las células dendríticas dérmicas (Yager, 1993).

La piel de los caninos varía en su grosor dependiendo de la ubicación anatómica, siendo más delgada en áreas con pelo y más gruesa en las almohadillas plantares y el plano nasal. A su vez, el pelaje y la pigmentación de la piel, generada por la melanina, le confieren la fotoprotección, así es como proporcionan un mecanismo de termorregulación, participando en este último también el flujo sanguíneo cutáneo. Asimismo, la piel es un sitio importante de regulación de la vitamina D. La luz solar actúa sobre la epidermis para convertir la provitamina D3 (7-deshidrocolesterol) a vitamina D3 (colecalfiferol), que luego en el hígado se hidroxila a 25-hidroxi D3, y formándose finalmente en los riñones la forma activa: 1,25-vitamina D3. La vitamina D3 es importante a nivel cutáneo pues regula la diferenciación y proliferación epidérmica. Podemos señalar entonces que la piel es un verdadero indicador de salud general del organismo (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

Los casos dermatológicos se presentan con alta frecuencia en la clínica de pequeños animales. Los médicos veterinarios suelen recurrir, como método complementario de diagnóstico, al examen de la piel mediante la toma de biopsias, las cuales se han convertido, actualmente, en una herramienta de diagnóstico de rutina. Una comprensión de la respuesta de la piel frente a

las noxas, como en cualquier tejido, requieren conocimiento de su estructura y función normales. Para poder interpretar las biopsias de la piel, los patólogos deben tener una adecuada historia clínica que les permitirá, en conjunto con el clínico, arribar a un diagnóstico más certero del proceso.

## **Estructura y funciones de la piel**

### *Epidermis*

La epidermis, capa más externa de la piel, es un sistema altamente organizado que se encuentra en renovación continua y está compuesto por un epitelio escamoso estratificado. Este epitelio tiene diferentes estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016). En la epidermis encontramos diferentes tipos celulares: los queratinocitos que representan el 85% de las células epidérmicas, los melanocitos (5%), las células de Langerhans (3-8%) y las células de Merkel (2%) (Lloyd y Garthwaite, 1982; Müller y col., 1997). Los queratinocitos son sometidos a un proceso de diferenciación y proliferación permanente que permite el recambio celular. Esta alta tasa de recambio celular facilita la reparación del tejido y proporciona un mecanismo de defensa frente a las noxas, siendo además una verdadera barrera protectora hidrofóbica. Existe en la epidermis un equilibrio entre la proliferación, la diferenciación y descamación celular. La renovación está a cargo de una pequeña población de células madre de ciclo lento (10% de las células) en la capa basal que sufre proliferación en forma transitoria mediante señales de las células amplificadoras. Las células amplificadoras

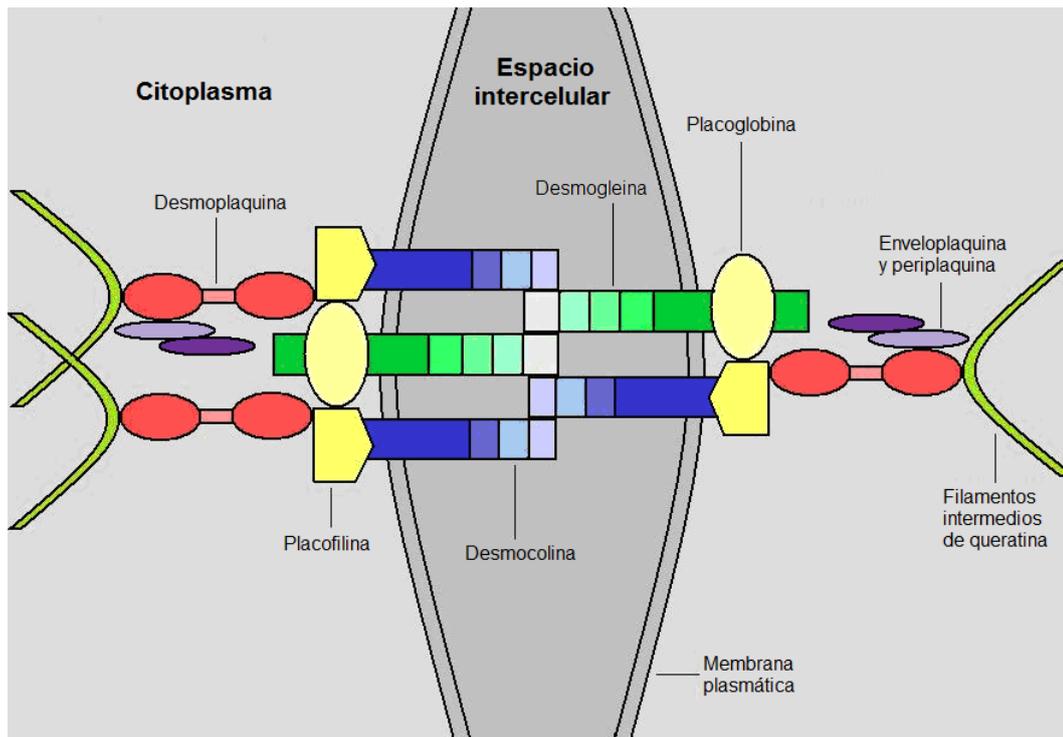
proliferan rápidamente luego de salir del ciclo celular y finalmente experimentan diferenciación terminal. Al hacerlo, las células marchan hacia el producto final, que son células totalmente queratinizadas, los queratinocitos anucleados (corneocitos) que se desprenden en la superficie de la piel (Campos- Granados, 2014; Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

La queratina es un filamento intermedio, cuya principal función es la de proveer la fuerza a las células epiteliales. Esta proteína forma el citoesqueleto del queratinocito y se conectan a los desmosomas, participando en las uniones intercelulares. Existen dos tipos de queratina, tipo I (ácida) y tipo II (básica) que se ensamblan en heterodímeros a través de enlaces disulfuro. La queratina pertenece a una familia muy diversa de proteínas, presentando patrones de expresión diferente en los diferentes epitelios. Existen queratinas duras, ricas en residuos de cisteína, que forman el pelo y las uñas. Otras, las citoqueratinas, son queratinas suaves, que se encuentran en las células epiteliales de la epidermis. Los queratinocitos de la capa basal proliferan, se diferencian y expresan abundantes citoqueratinas. La queratina 5 (K5) y la queratina 14 (K14) forman heterodímeros en queratinocitos de la capa basal. Los queratinocitos suprabasales están asociados con la inducción de queratinas 1 y 10 (K1 y K10), mientras que la queratina 2 (K2) se expresa en el estrato granuloso (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

El estrato basal es la capa germinativa profunda de la epidermis y se compone de una sola capa de células cilíndricas a columnares bajas, que descansan sobre una membrana basal. Las células basales están unidas a la membrana basal subyacente por los hemidesmosomas y a los queratinocitos adyacentes y suprayacentes por los desmosomas. Los desmosomas son estructuras de anclaje que median la adhesión entre las células (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016). Están conformados por una estructura compleja de proteínas denominadas del centro y de la placa que se unen a las queratinas intracelulares que le otorgan mayor fortaleza al epitelio. La ruptura de las conexiones demosomales intercelulares epidérmicas, por ejemplo, por medio de la unión de inmunoglobulinas (Igs), origina acantólisis, característica presente en gran número de enfermedades autoinmunes (Miller y col., 2014; Olivry, 2012).

Los desmosomas están formados por tres grandes familias de proteínas (figura 1): las cadherinas transmembrana, las proteínas de la familia de armadillo y las plaquinas. Los miembros de la familia cadherina, las desmogleinas 1 a 4 (Dsg) y desmocolinas 1 a 3 (Dsc) son parte de la interfase adhesiva y sus colas citoplasmáticas proporcionan una plataforma de unión para la placoglobina (PG) y la placofilina (PFi), proteínas de la familia armadillo. Los miembros de la familia plaquinas, desmoplaquina 1 y 2 (DP), enveloplaquina (EP) y periplaquina (PP), se enlazan con los filamentos intermedios del citoesqueleto otorgándole mayor rigidez a la unión (Ellebrecht y Payne, 2014; Green y Simpson, 2007). En la patogenia

de los diferentes péngigos la Dsg1, Dsg3 y Dsc1 son los principales autoantígenos. La Dsg1 y Dsc1 se encuentran en las capas más superficiales de la epidermis (estrato granuloso y espinoso), mientras que, la Dsg3 predomina en las capas basales y suprabasales de la epidermis (Bizikova y col., 2012; Miragliotta y col., 2005)



**Figura 1:** estructura y componentes del desmosoma

El estrato espinoso se caracteriza por presentar gran número de desmosomas, compuesto al menos por 3-4 capas de células grandes, poliédricas, con un ligero aplanamiento en las células más superficiales. Esta capa es mucho más gruesa en la piel sin pelo, y puede tener hasta 20 células de espesor en las almohadillas y en el plano nasal. Las células del estrato espinoso se relacionan entre sí por puentes intercelulares formados por prolongaciones citoplasmáticas que se asemejan a espinas. Las fibrillas

de queratina son más numerosas en estas prolongaciones y es allí donde se anclan los numerosos desmosomas de este estrato. (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

El estrato granuloso es variablemente más delgado, siendo en la piel con pelo de sólo 1-2 células de espesor, mientras que, en la piel sin pelo, esta capa es un poco más prominente, promediando 4-8 capas. Las células son aplanadas, con núcleos pequeños y en su citoplasma se pueden observar gránulos de queratohialina, que le da una coloración más azulina con las tinciones de rutina. Los gránulos contienen un precursor de filagrina, una proteína de matriz interfibrilar rica en histidina que funciona como un pegamento biológico que agrega y alinea los filamentos de queratina (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

El estrato córneo se compone de la superposición de 20 o más capas de células anucleadas, poliédricas a ligeramente aplanadas, intercaladas entre capas de material lipídico. Esta capa es una barrera hidrofóbica activa y resistente que regula el movimiento del agua dentro y fuera de la piel. En las biopsias, es posible que gran parte del contenido del estrato corneo se pierda durante la toma de muestra, o bien durante el procesamiento de la misma. Muchas veces se observa un patrón de tejido de canasta, el cual es un artefacto resultante por la pérdida de laminillas lipídicas durante el procesamiento. El espesor de esta capa varía según la especie y el sitio, pero generalmente se adapta al grado de trauma superficial o fricción, siendo más gruesa en áreas sin pelo, como almohadilla y plano nasal (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

La cornificación (queratinización) es el proceso por el cual los queratinocitos sufren su diferenciación terminal desde la capa basal hasta el corneocito altamente especializado. Al hacerlo, los queratinocitos deben perder gran cantidad del volumen de agua, siendo del 70% en capas nucleadas y del 15% en el estrato córneo. Deben ocurrir varios pasos para que la cornificación ocurra normalmente: (1) acumulación de queratina en la célula, (2) reemplazo de la membrana celular con formación de una envoltura cornificada, (3) formación de bicapas lipídicas, y (4) descamación activa. Las alteraciones en cualquier paso pueden conducir a hiperqueratosis, descamación excesiva y función disminuida de la barrera. Los lípidos están presentes en los orgánulos llamados cuerpos lamelares, que también se los denomina cuerpos Odland, gránulos de revestimiento de membrana, gránulos lamelares o queratinosomas, los cuales se sintetizan en el estrato espinoso superior. En el límite entre el estrato granuloso y el corneo los cuerpos lamelares se fusionan con la membrana celular y expulsan sus contenidos al espacio intercelular. Estos cuerpos contienen glucosilceramidas, esfingomiélin, glicerofosfolípidos y sulfato de colesterol, junto con muchas enzimas modificadoras. Durante este lanzamiento, las enzimas modifican lípidos polares "pro barrera" en lípidos no polares "barrera". El producto final de las bicapas lipídicas del estrato corneo contiene una proporción equimolar de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres que juntos crean un verdadero sello hidrofóbico. El núcleo proteico del corneocito proporciona gran parte de la integridad estructural del estrato córneo. La profilagrina, encontrada en los gránulos

de queratohialina del estrato granuloso, se somete al procesamiento (proteólisis, desfosforilación) activo mediante la enzima filagrina, que combina la queratina citoplasmática con la queratina filamentosa. Las transglutaminasas, enzimas que contienen calcio, están ubicadas dentro de la epidermis y los folículos pilosos. Estas proteínas, en particular, transglutaminasa 1, catalizan la formación de la envoltura cornificada mediante la reticulación de pequeñas moléculas de proteínas (por ejemplo, involucrina, loricrina, cistatina A) que van a reemplazar la membrana celular. Esta envoltura rodea el núcleo proteico y proporciona una barrera mecánica, así como un andamio que organiza los lípidos extracelulares en membranas lamelares (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

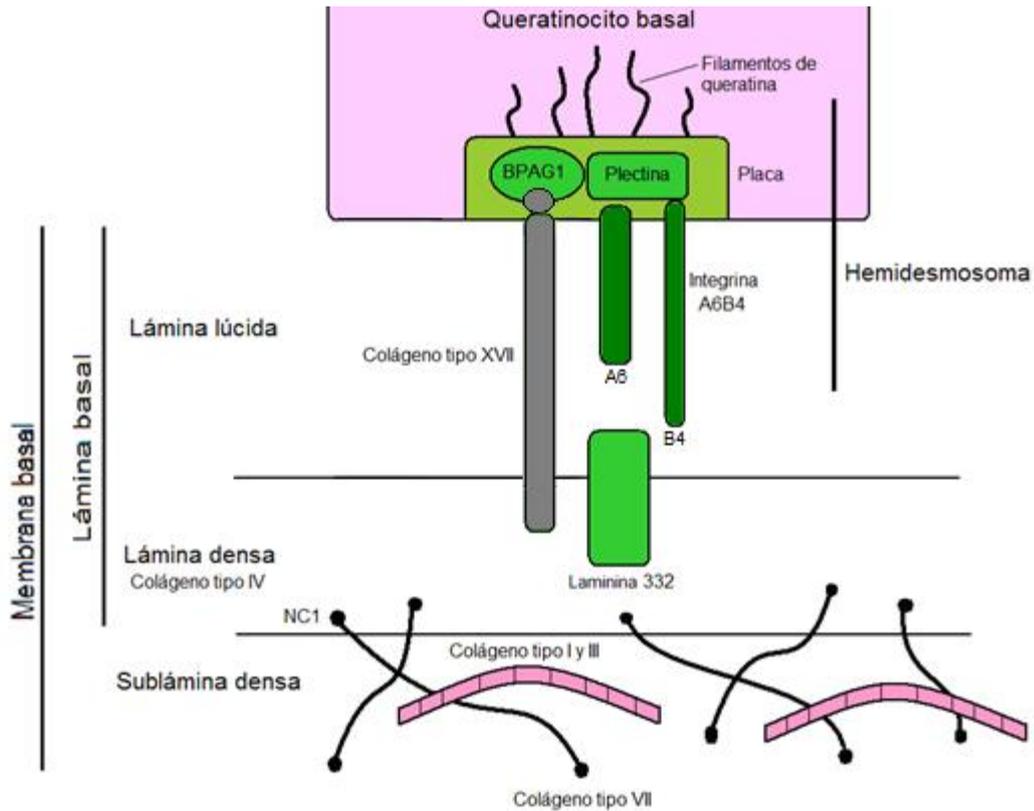
Otras células que encontramos en la epidermis son los melanocitos. Estos son derivados embriológicamente de las células de la cresta neural, y están presentes en las capas inferiores del estrato espinoso y producen un pigmento “melanina”, que da color a la piel y al pelo. Los gránulos melanocíticos se transfieren y se distribuyen entre los queratinocitos para ayudar a proteger de la luz ultravioleta. Además, están presentes las células de Langerhans. Estas son células derivadas de la médula ósea del linaje monocito-macrófago que procesa y presenta antígenos (Ag) a los linfocitos T (Lf T) sensibilizados, modulando respuestas inmunológicas de la piel. Las células de Langerhans están presentes en los estratos basal, espinoso y granuloso de la epidermis, pero tienen preferencia por una posición suprabasal. Otro tipo celular son las células de Merkel que se

encuentran en la capa basal, adjuntas a los queratinocitos a través de uniones desmosomales, y expresan proteínas de queratina 8, 18, 19 y 20. Las células de Merkel se encuentran en la piel con y sin pelo, particularmente en regiones del cuerpo con mayor sensibilidad táctil (dedos y labios), y en la porción externa de los folículos pilosos. Cuando las células de Merkel están asociadas con un axón, forman un complejo Merkel célula-neurita y funciona como un mecanorreceptor de adaptación lenta. Las áreas especializadas de la piel que contienen estos complejos de Merkel se conocen como almohadillas de tylotrich (pelos táctiles). Las células de Merkel tienen gránulos con mediadores químicos (metenquefalina, péptido intestinal vasoactivo, cromogranina A, acetilcolina, calcitonina, enolasa y sinaptofisina). Además de funcionar como mecanorreceptores, las células de Merkel también influyen en la proliferación de los queratinocitos, estimulan y mantienen células madre del folículo piloso, y alteran el flujo sanguíneo y la producción de sudor. Se cree que el origen de las células de Merkel es una célula madre epidérmica primitiva (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

### *Unión dermo-epidérmica*

La epidermis, al igual que los epitelios de las mucosas, se adhiere al tejido conectivo subyacente a través de una interacción compleja entre las moléculas intra y extracelulares en la zona de la membrana basal. (Olivry y col., 2010). La unión dermo-epidérmica (D-E) (Figura 2) está conformada por los queratinocitos basales, la membrana basal y los hemidesmosomas.

Los queratinocitos basales presentan un citoesqueleto con filamentos intermedios de queratina que se conectan con la membrana basal a través de los hemidesmosomas. La membrana basal se subdivide en la lámina basal compuesta por la lámina lúcida y la lámina densa, conformada principalmente por laminina 332 y colágeno tipo IV. Además, se puede observar la sublámina densa que se localiza en la interfase entre la lámina densa y la dermis papilar. Contienen estructuras denominadas fibrillas y placas de anclaje junto a proteínas fibrilares dérmicas (colágeno tipo I, III y VII). Los hemidesmosomas son estructuras con función de anclaje y señalización celular que están situados en la membrana plasmática basal de los queratinocitos basales. Las proteínas fundamentales del hemidesmosoma son colágeno XVII, plectina, antígeno penfigoide bulloso tipo 1 (BPAG1/BP230) e integrina  $\alpha 6\beta 4$  (Campos Domínguez y col., 2006).



**Figura 2:** Estructura de la unión D-E y del hemidesmosoma

### *Dermis*

La dermis (corium) consiste en colágeno y fibras elásticas contenidas en una sustancia de fondo de glucosaminoglicanos. En ella se encuentran los folículos pilosos, glándulas, vasos y nervios. Por convención, la dermis está subdividida en capas superficiales y profundas que se mezclan sin una línea clara de demarcación. La dermis superficial se corresponde con el contorno de la epidermis y generalmente soporta la porción superior del folículo piloso y las glándulas sebáceas y está compuesta por fibras finas de colágeno. La dermis profunda soporta la porción inferior del folículo piloso y las glándulas apocrinas y se compone de haces de colágeno más gruesos que los de la dermis superficial. Las fibras musculares del músculo

erector del pelo unen el tejido conectivo desde la vaina del folículo piloso hasta la epidermis y son responsables del movimiento del mismo. Fibras musculares esqueléticas del músculo cutáneo se extienden hasta la dermis inferior y son responsables del movimiento voluntario de la piel. También encontramos células como mastocitos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, y rara vez se pueden encontrar eosinófilos y neutrófilos en la dermis normal. Estas células son derivadas de la médula ósea y llegan a través del sistema vascular sanguíneo; por lo tanto, se concentran típicamente alrededor de pequeños vasos sanguíneos superficiales. La dermis es responsable de la mayor parte de la resistencia a la tracción y la elasticidad de la piel; participa en la regulación del crecimiento, la proliferación, la adhesión, la migración y la diferenciación celular, y modula la cicatrización de heridas (Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016; Miller y col., 2014).

### *Hipodermis*

La hipodermis o subcutis une la dermis al músculo o hueso subyacente. Hay algunas excepciones regionales donde el subcutis puede estar ausente, como en el labio, la mejilla, el párpado, el oído externo y el ano. Está formada principalmente por tejido adiposo, fibras colágenas y elásticas, que proporcionan flexibilidad. El tejido adiposo aísla contra la variación de temperatura y en el caso de las almohadillas sirve para la absorción de impactos. El tejido adiposo también almacena calorías como triglicéridos. En recientes estudios se mostró evidencia que las células

adiposas secretan ya sea por vía autocrina, paracrina y/o endocrina, una variedad de citocinas, quimiocinas, hormonas, y factores como la adiponectina, leptina, resistina, factor de necrosis tumoral (TNF, abreviatura del inglés tumor necrosis factor), interleuquina 6 (IL) y también proteínas de fase aguda. Además, tiene una función importante como reservorio y sitio para el metabolismo de compuestos esteroides y la producción de estrógenos (Miller y col., 2014).

### **La piel y su rol en la inmunidad**

El sistema inmunitario se considera un conjunto de redes celulares y moleculares interactivas en el cual la presencia de invasores extraños provoca cambios de las actividades celulares y da lugar a una serie creciente de respuestas celulares y moleculares que culmina en la eliminación de los invasores, en el mejor de los casos, y en una mayor resistencia a la infección. El sistema inmune posee tres componentes bien definidos que interactúan y se interrelacionan entre ellos: las barreras físicas, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Tizard, 2019).

Las barreras físicas representan la primera línea de defensa. La piel intacta, el tracto respiratorio y el gastrointestinal proporcionan una barrera efectiva frente a la invasión microbiana (Miller y col., 2014; Tizard, 2019). La epidermis es el primer mecanismo de defensa contra sustancias nocivas externas, ya sean parásitos, agentes infecciosos como estafilococos y *Malassezia* o alérgenos. El estrato corneo es una barrera difícil de penetrar por la presencia de capas superpuestas de corneocitos aplanados y

entrelazados muy firmemente. Además, la continua descamación de los corneocitos, la desecación, el bajo pH y la microbiota bacteriana residente contribuyen a formar una barrera física potente (Miller y col., 2014; Tizard, 2019). Dentro de la capa cornea, la emulsión intercelular contiene cloruro de sodio, albúmina, complemento, transferrina, interferones, lípidos y anticuerpos (Ac) que proporcionan protección adicional. La epidermis también puede producir péptidos con funciones antibióticas como las defensinas que sufren regulación positiva en respuesta a citocinas inflamatorias como la IL 1 y TNF (Miller y col., 2014).

La inmunidad innata es un sistema conformado por diversos subsistemas que operan a través de muchos mecanismos diferentes y que actúan cuando las barreras físicas fallan. En conjunto, todos ellos responden con rapidez para bloquear la invasión microbiana o parasitaria y minimizar el daño tisular (Tizard, 2019). Está compuesta por enzimas o péptidos antimicrobianos, proteínas solubles como el complemento, células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, linfocitos intraepiteliales, las células naturales asesinas o como se las denomina “natural killer” (NK), mastocitos y, además la producción de una gran variedad de citocinas y quimiocinas. Muchas células situadas cerca de la superficie del cuerpo poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRR, abreviatura del inglés, Pattern recognition receptor) llamados receptores tipo Toll (TLRs, abreviatura del inglés, Toll-like receptor) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, abreviatura del inglés, Pathogen-associated molecular patterns) comunes

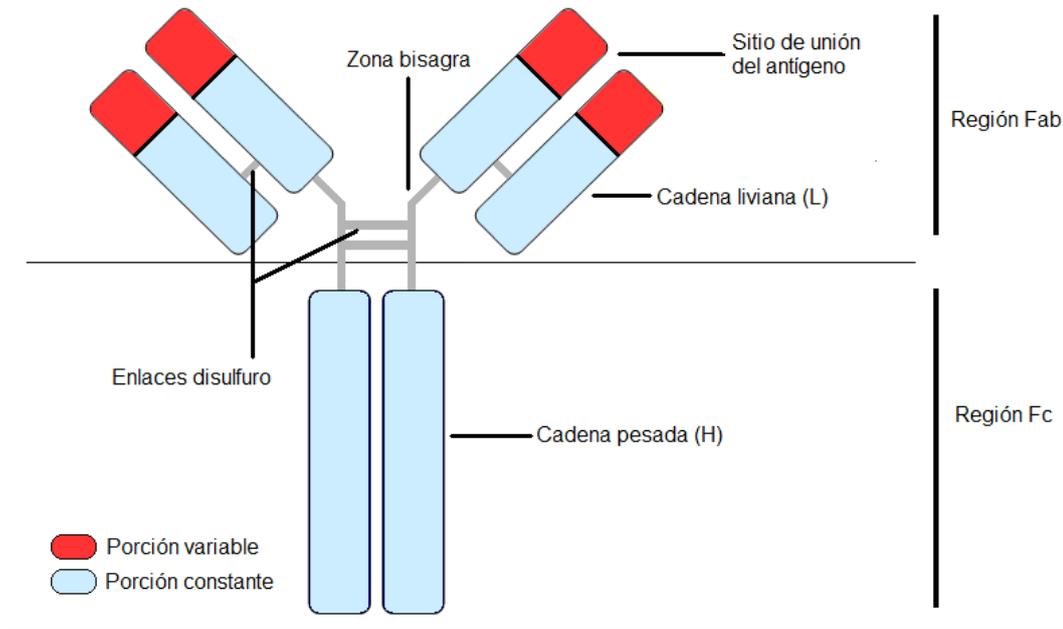
a la invasión de organismos. Los PAMPs incluyen peptidoglicanos, lipopolisacáridos, glucolípidos y carbohidratos ricos en manosa. Los TLR se encuentran en los macrófagos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas y células epiteliales (Miller y col., 2014). Un rol central en el sistema inmune innato de la piel lo cumplen los queratinocitos que expresan múltiples PRR, como son los receptores TLR, los receptores de manosa y las lectinas tipo C, por lo que son capaces de reconocer PAMPs asociados con la invasión microbiana. Tras su estimulación, los queratinocitos producen la secreción de una compleja combinación de IL, interferones, quimioquinas y otras citocinas, factores de crecimiento y proteínas antimicrobianas. Los queratinocitos son la principal fuente de catelicidinas y de  $\beta$  defensinas y expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, pudiendo actuar como células presentadoras de Ag al igual que las células dendríticas y los macrófagos. Entre los mecanismos de defensa que presenta el sistema inmune innato, el principal es la inflamación, la cual involucra aumento de temperatura y aumento en la irrigación sanguínea hacia el área afectada, llevando consigo los diferentes tipos celulares que el organismo produce con este fin. (Ansel, 1990; Gibson, 1991; Tizard, 2019).

Por último, la inmunidad adaptativa, tiene como función reconocer y destruir a los invasores de forma específica generando memoria. Es el último nivel de defensa del organismo. Los invasores pueden dividirse en 2 categorías: los microorganismos extracelulares (bacterias, hongos, protozoos y helmintos) y los microorganismos intracelulares (virus, bacterias y

protozoos intracelulares). Cada categoría requiere una estrategia defensiva diferente, por lo que el sistema inmune adaptativo posee dos ramas principales. Ambas ramas dependen de leucocitos especializados denominados linfocitos. Los linfocitos B se encargan de los microorganismos extracelulares produciendo Ac (Igs) que favorecen la destrucción microbiana. Esta respuesta inmunitaria mediada por linfocitos B (Lf B) se denomina inmunidad humoral. Luego de la activación de los Lf B, estos proliferan y se diferencian a células plasmáticas que secretan grandes cantidades de Igs. Hay cinco isotipos distintos de Igs: IgM, IgG, IgA, IgE y IgD, las que participan directa o indirectamente en la eliminación o neutralización de Ag. Las Igs son glicoproteínas que están constituidas por cuatro cadenas peptídicas: un par de cadenas pesadas y un par de cadenas ligeras unidas entre sí por puentes disulfuro de modo que la molécula completa adopta una forma de Y. La base de la Y, denominada región Fc (fragmento cristalizable), está formada por las dos cadenas pesadas y está anclada a la superficie del Lf B. Los brazos de la Y, denominados región Fab (fragmento de unión al antígeno) están formados por las parejas de las cadenas ligeras y pesadas y son la zona de unión de los antígenos. (Figura 3). Entre las funciones de las Igs en la fase efectora de la respuesta inmune se destaca la neutralización de toxinas, virus, bacterias, impidiendo su unión a células u otras estructuras. La inmunidad frente a invasores intracelulares depende de los Lf T, su función es la de destruir células infectadas o anómalas. Este tipo de respuesta se denomina inmunidad celular. En función de la expresión de las moléculas de CD8 y

CD4, se distinguen dos subpoblaciones de Lf T: CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. Los Lf T CD8<sup>+</sup> intervienen en la destrucción de células infectadas por virus o células tumorales. Los Lf T CD4<sup>+</sup> se diferencian de acuerdo al patrón de citoquinas que producen: Th1 (producen interferón- $\gamma$  y activación de macrófagos), Th2 (movilización de eosinófilos y mastocitos), Th17 (movilización de neutrófilos), Thf (colaboración con linfocitos B) y Treg. (mediante mecanismos supresores) (Geffner, 2011). Las células dendríticas se encuentran tanto en la dermis como en la epidermis, son células presentadoras de antígenos. Las más conocidas en la piel son las células de Langerhans que se unen a Ag exógenos y los presentan a los Lf Th. Los Lf T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de la piel sana se localizan principalmente en la capa basal, asociados a dichas células (Tizard, 2019).

En este sentido queda en claro que el sistema inmune de la piel es un componente activo del sistema inmunológico general y ayuda a defender al hospedador contra muchas agresiones (Tizard, 2019). En dermatología veterinaria existen muchas situaciones en las que la activación del sistema inmune de la piel produce más daños que beneficios. La piel animal es constantemente atacada por parásitos, bacterias, hongos, virus y alérgenos, todos ellos pueden desencadenar una respuesta inmune indeseable generando respuestas de hipersensibilidad y autoinmunidad (Miller y col., 2014).



**Figura 3:** esquema de la estructura de una inmunoglobulina

### **Dermatosis de origen inmune**

Si bien el sistema inmune de la piel actúa como un mecanismo de protección frente a la invasión de agentes externos, muchas veces puede ser ineficaz o, en algunos casos, perjudicial generando lesiones importantes en el propio organismo, como son las dermatosis de origen inmune (Miller y col., 2014).

Las dermatosis de origen inmune se dividen en dermatosis por hipersensibilidad, autoinmunes y otras enfermedades inmunes de etiología diversa. La hipersensibilidad es una reacción exagerada del sistema inmunológico, que puede presentarse como lesiones leves a severas, donde se desarrolla una respuesta a compuestos extraños pero que son normalmente inofensivos (antiseros, polen, venenos de insectos, etc.)

(Hargis y Myers, 2017; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016). En otras ocasiones el sistema inmune no distingue en forma adecuada entre las moléculas extrañas y las moléculas propias, dando lugar a una falla de los mecanismos de tolerancia, que origina una respuesta exagerada que se manifiesta en forma de enfermedad autoinmune. Estas enfermedades se desarrollan cuando los Ac o Lf T reaccionan contra las estructuras normales de la piel generando daño (Hargis y Myers, 2017; Miller y col., 2014). En el caso de las enfermedades inmunomediadas de etiología diversa, el Ag es ajeno al organismo, como sucede con fármacos, bacterias y virus que estimulan una reacción inmunológica que redunde en daño tisular del hospedador (Lewis y Picut, 1989; Miller y col., 2014).

Las enfermedades autoinmunes de la piel de caninos son poco frecuentes y, en la gran mayoría de los casos, se desconoce el desencadenante de la producción de Lf T o B contra estructuras propias (autoantígenos) (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

Las dermatosis autoinmunes se dividen en tres grandes grupos: enfermedades que componen el complejo pénfigo (CP), enfermedades ampollares subepidérmicas autoinmunes (EASA) y los diferentes tipos de lupus.

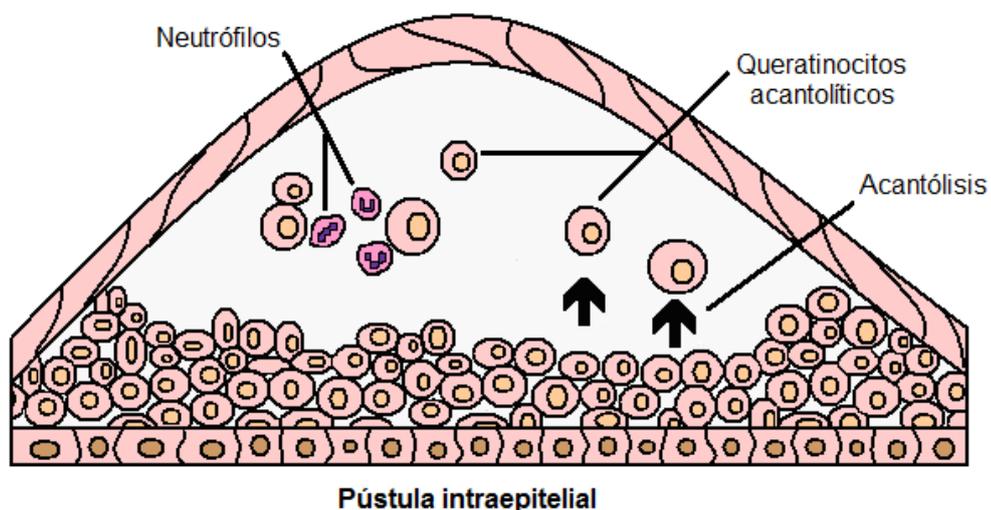
### **Complejo pénfigo**

El CP abarca un grupo de enfermedades autoinmunes de la piel que ha sido descrita en diversas especies (perro, gato, caballo, cabra, oveja, llama y mono), que se caracterizan por la pérdida de cohesión entre las

células epidérmicas, fenómeno conocido como acantólisis. Esto da como resultado la aparición de pústulas y/o vesículas intraepiteliales con presencia de queratinocitos acantolíticos y, en ocasiones, neutrófilos y eosinófilos (Figura 4) (Burge y col., 1993; Gross y col., 2005; Hargis y Myers, 2017; Ide y col., 2010; Peters y col., 2007). Como se dijo con anterioridad, los desmosomas son estructuras intercelulares complejas fundamentales en la adhesión entre células y se encuentran en todos los epitelios (principalmente en epidermis e intestino) aunque también en el músculo cardíaco (Ide y col., 2010; Olivry y Linder, 2009). En el CP se observa una unión de autoanticuerpos a los diferentes componentes del desmosoma, no solo en aquellos ya formados, donde ocasiona su ruptura y da lugar a acantólisis y desorganización del citoesqueleto, sino también interfieren en el ensamble de los nuevos desmosomas en formación (Olivry y Linder, 2009; Spindle y Waschke, 2008).

Las dermatosis acantolíticas epidérmicas no solo tienen un origen autoinmune, sino que también existen otros mecanismos de desarrollo lesional como las dermatosis de origen genético y proteolítico. La degradación proteolítica desmosómica puede adicionalmente ser dividida en causa bacteriana (estafilocócica) o fúngica (dermatofitosis) (Olivry, 2012). La lesión cutánea es similar en los diferentes procesos, es por esto que es difícil de diferenciar en la clínica e incluso en la observación con el microscopio óptico, siendo entonces una dificultad para los médicos veterinarios y dermatólogos determinar si la acantólisis es de origen genético, autoinmune o infeccioso. En caninos se describieron casos

aislados de dos enfermedades acantolíticas de origen genético, la enfermedad de Darier canina y la displasia ectodérmica/síndrome de fragilidad cutánea canina ambas reconocidas también en medicina humana. Son dermatosis vesiculares acantolíticas autosómicas recesivas (Olivry y Linder, 2009). En las enfermedades acantolíticas de origen proteolítico encontramos a los dermatofitos, como *Microsporum* spp. y *Trichophyton* spp. que producen queratinasa y otras enzimas proteolíticas que pueden inducir acantólisis *in vitro* (Peters, 2007). En los procesos de origen infeccioso, las enzimas proteolíticas pueden ser liberadas por los neutrófilos, eosinófilos o por los mismos agentes causales. En la foliculitis bacteriana, los neutrófilos liberan enzimas hidrolíticas que pueden interrumpir las adhesiones intercelulares resultando también en acantólisis. A su vez, la acantólisis también puede ser una característica de algunas dermatosis inflamatorias, infecciosas, o inducidas por fármacos. (Peters, 2007)



**Figura 4:** proceso de acantólisis y formación de una pústula intraepitelial.

### *Diferentes tipos*

Se han descrito cuatro tipos de pénfigo en perros, los cuales se clasifican de acuerdo con las manifestaciones clínicas e histopatológicas en pénfigo foliáceo (PF), pénfigo eritematoso (PE), pénfigo vulgar (PV) y pénfigo paraneoplásico (PPN) (Ide y col., 2010).

- *Pénfigo foliáceo*

Es la enfermedad autoinmune más frecuente dentro del CP en caninos (Bizikova y col., 2012; Ihrke y col., 1985; Olivry, 2006, Olivry y Linder, 2009).

La enfermedad se desarrolla en perros de mediana edad hasta añosos, pero los signos clínicos pueden comenzar en cualquier momento de la vida.

Los datos sobre predilección racial varían, aunque algunos autores señalan a ciertas razas como las más predispuestas que incluyen a los Akita, Chow chow, Dachshund, Cocker Spaniel y Labrador Retriever. No se ha documentado incidencia por sexo (Miller y col., 2014).

Los primeros estudios reconocieron como Ag a la Dsg1, sin embargo, la Dsg1 es reconocida en menos del 10% de los pacientes con esta enfermedad (Olivry y col., 2006; Olivry y col., 2008; Yabuzoe y col., 2009).

Posteriormente, en 2012 se propuso a la Dsc1 como el autoantígeno más importante en caninos con PF, observándose Ac contra esta proteína en el 85% de los casos caninos estudiados (Bizikova y col., 2012).

Cuando los autoanticuerpos se unen a la Dsc1, expresada superficialmente en la epidermis, se produce acantólisis y se desarrollan lesiones erosivas poco profundas, con formación de vesículas y pústulas (Nishifuji y col., 2007). Estas lesiones rápidamente evolucionan a erosiones y costras (Kuhl

y col., 1994; Miller y col., 2014; Olivry y Linder, 2009). Las regiones anatómicas inicialmente afectadas son la región de la cara, principalmente en dorsal de la nariz, el plano nasal, la región infraorbitaria o bien en la zona periocular y en la piel de los pabellones auriculares. En estas áreas, la distribución es bilateral y simétrica. En algunos casos, menos frecuente, se presenta una distribución generalizada, encontrándose lesiones en todo el cuerpo y en las almohadillas plantares (Ihrke y col., 1985; Miller y col., 2014; Olivry y Chan, 2001; Olivry, 2006; Olivry y Linder, 2009). Se ha asociado un cuadro clínico de PF con trombocitopenia inmunomediada (Kawarai y col., 2015).

El principal diagnóstico diferencial clínico es la foliculitis bacteriana superficial (Gross y col., 2005). El PF también puede aparecer visualmente similar a otras enfermedades exfoliativas de la piel con formación de costras o pústulas, como el lupus eritematoso (LE), la demodicosis, la dermatosis sensible al zinc, la adenitis sebácea, la micosis fungoide y la dermatofitosis pustulosa superficial acantolítica causada por *Trichophyton* spp (Peters y col., 2007).

Microscópicamente se observa espongirosis, acantosis y acantólisis con presencia de pústulas y vesículas subcorneales, intraepidérmicas o suprabasales (Olivry y Linder, 2009; Vaughan y col., 2010), tanto en la epidermis como en la pared de los folículos pilosos (Gross y col., 2005). En su interior, las pústulas, presentan principalmente neutrófilos y en menor cantidad eosinófilos. También se pueden observar grupos de células acantolíticas libres o bien formando parte de la pared de las vesículas

(Gross y col., 2005; Peters y col., 2007). Es frecuente encontrar abundantes neutrófilos en íntima relación con los queratinocitos acantolíticos, lo que sugiere que estos jugarían un papel auxiliar en la disociación de los queratinocitos (Yabuzoe y col., 2008). Mediante técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el uso de microscopía electrónica en pústulas de la piel de caninos con PF se puso en evidencia el contacto de los neutrófilos con la membrana de los queratinocitos y el estrecho contacto con las estructuras desmosómicas (Yabuzoe y col., 2008). En los puntos de contacto entre los neutrófilos y los queratinocitos acantolíticos, se observaron los desmosomas de los queratinocitos acantolíticos dentro de invaginaciones de los neutrófilos. Además, sobre la superficie de las células acantolíticas, en el interior de las pústulas, se observaron los gránulos de los neutrófilos, probablemente responsables de degradar los desmosomas. Los neutrófilos también se observaron dentro de la epidermis adyacente a la pústula. Estos resultados en conjunto sugieren que el contacto de neutrófilos con estructuras desmosómicas parecerían ser los responsables finalmente de la separación de los queratinocitos (Yabuzoe y col., 2008). En dermis superficial se observa inflamación perivascular e intersticial acompañada de edema, ectasia vascular y congestión. El infiltrado inflamatorio está compuesto por neutrófilos y eosinófilos, que se entremezclan con un menor número de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (Gross y col., 2005). Los principales diagnósticos diferenciales histopatológicos para el PF incluyen todos los otros tipos de pénfigo, el impétigo ampollar, la reacción

a fármacos que originen pústulas superficiales, y la dermatofitosis pustulosa superficial acantolítica (Gross y col., 2005).

- *Pénfigo eritematoso*

El PE es una enfermedad cutánea que combina lesiones cutáneas pustulosas superficiales, similares a las del PF, con lesiones cutáneas nasales ulcerativas profundas que recuerdan a aquellas presentes en animales con lupus eritematoso discoide (LED) (Bhang y col., 2008; Olivry y Linder, 2009). En el PE no se han reportado predilecciones por sexo o por edad. En relación a las razas caninas más afectadas, algunos autores señalan al Collie y al Pastor Ovejero Alemán como las más predispuestas (Gross y col., 2005).

El principal autoantígeno es la Dsg1 y secundariamente se ha reconocido a la PP (Olivry, 2006).

Las lesiones consisten en pústulas que evolucionan a úlceras, erosiones y finalmente costras. También pueden observarse áreas con despigmentación. La localización de las lesiones frecuentemente es en la región de la cara, principalmente en la región de la nariz y en la piel de los pabellones auriculares (Bedolla y col., 2009; Miller y col., 2014; Olivry, 2006).

Microscópicamente se observa espongirosis, acantosis y acantólisis con presencia de pústulas acantolíticas neutrofílicas y eosinofílicas, intraepidérmicas y subcorneales, similares a las observadas en el PF. En la unión de la dermis con la epidermis se evidencia un infiltrado de células mononucleares, células plasmáticas, neutrófilos y eosinófilos, que se

corresponde con lo que se denomina infiltrado liquenoide de interfase. Esta lesión recuerda a las descritas en el LED (Gonsalves-Hubers, 2005; Olivry, 2006).

Los diagnósticos diferenciales clínicos e histopatológicos del PE son las mismas enfermedades que las descritas para el PF, incluyendo también en este caso al LED.

- *Pénfigo vulgar*

El PV es una enfermedad autoinmune severa y poco frecuente de la piel de los caninos. Se caracteriza por la formación de vesículas, ampollas y, posteriormente, úlceras en uniones mucocutáneas o exclusivamente en membranas mucosas (Gross y col., 2005).

El PV tiene una mayor predisposición a presentarse en machos, superando en número a las hembras por aproximadamente dos a tres veces. La edad media de inicio de síntomas es de 6 años, aunque se pudo observar también en animales de tan sólo 1 año de edad (Gross y col., 2005; Olivry y col., 2003). Si bien no se han reportado muchas referencias en relación a la predisposición racial, algunos autores señalan al Pastor Ovejero Alemán y al Collie como las razas más afectadas (Gross y col., 2005).

En el PV de las mucosas, el autoantígeno es la Dsg3 que se encuentra ubicado en la profundidad del epitelio mucoso (Nishifuji y col., 2007; Olivry y col., 2003; Waschke J. 2008), mientras que en el PV de ubicación mucocutáneo se ha detectado a la Dsg1 en combinación con Dsg3 (Nishifuji y col., 2007). Los autoanticuerpos en la epidermis o epitelio de la mucosa se unen a la Dsg3, originando acantólisis suprabasal (Gross y col., 2005).

Otros autores citan también a la PG como participante en la formación de las lesiones (Caldelari y col., 2001).

Las lesiones primarias consisten en vesículas y ampollas que evolucionan rápidamente a erosiones y úlceras irregulares (Olivry y Linder, 2009). Las lesiones se presentan inicialmente en la mucosa oral y uniones mucocutáneas. También se han descrito lesiones en la región axilar e inguinal (Miller y col., 2014; Olivry y Linder, 2009). El lecho ungueal puede estar afectado presentando paroniquia ulcerativa y onicomadesis (Gross y col., 2005; Miller y col., 2014). En los animales afectados suele verse el signo de Nikolsky positivo (Miller y col., 2014; Olivry y Linder, 2009). Los pacientes con enfermedad severa pueden presentar signos sistémicos como letargia, anorexia y pérdida de peso (Olivry y Linder, 2009).

Los principales diagnósticos diferenciales clínicos del PV abarcan el PPN, el penfigoide de las membranas mucosas (PMM), el penfigoide bulloso (PB), la epidermólisis ampollosa adquirida (EBA), el lupus eritematoso sistémico (LES), el eritema multiforme, la necrólisis epidérmica toxica, la reacción medicamentosa, la candidiasis, el lupus eritematoso vesicular cutáneo (LEVC), el linfoma epiteliotrópico y la dermatitis ulcerativa.

Microscópicamente, las lesiones más tempranas consisten en espongirosis epidérmica y vacuolización suprabasal (Olivry y Chan, 2001), mientras que las lesiones tardías se caracterizan por acantólisis suprabasal y la formación de vesículas suprabasales (Femiano, 2007) con células acantolíticas libres (Gross y col., 2005). Las células basales se mantienen unidas a la zona de membrana basal como una "hilera de lápidas" (Gross

y col., 2005; Miller y col., 2014). La separación epitelial también puede producirse en el infundíbulo folicular y sus anexos glandulares (Olivry y Chan, 2001). Se describe, además, una forma alopécica, menos frecuente, donde la separación suprabasal se limita al istmo y segmentos inferiores del folículo piloso, sin que se observe acantólisis suprabasal de la epidermis (Olivry y Jackson, 2001a). El infiltrado inflamatorio en dermis puede ser perivascular superficial, intersticial o liquenoide (Gross y col., 2005; Olivry y Jackson, 2001b).

El diagnóstico diferencial histopatológico no es complicado en los casos en que se ha encontrado en la característica hendidura suprabasal y la típica formación de “hilera de lápidas”. Se debe considerar al PPN como el principal diagnóstico diferencial (Gross y col., 2005; Miller y col., 2014).

- *Pénfigo paraneoplásico*

El PPN es una enfermedad autoinmune severa y poco frecuente, caracterizada por la formación de ampollas asociada a enfermedades neoplásicas (Elmore y col., 2005; Gross y col., 2005; Olivry y col., 2000a). La literatura solo reporta tres casos en perros seniles que presentaban neoplasias, un timoma, un linfoma tímico metastático y un sarcoma indiferenciado (Olivry y Linder, 2009).

Las pruebas inmunológicas revelan autoanticuerpos IgG circulantes contra la Dsg3 y contra las plaquitas EP, PP y DP 1 y 2 (De Bruin y col., 1999; Elmore y col., 2005).

El PPN se caracteriza por la formación de ampollas y erosiones localizadas principalmente en las mucosas o uniones mucocutáneas (Olivry y col.,

2000a). Los signos sistémicos consisten en hipertermia, letargia y depresión (Olivry y Linder, 2009).

Los principales diagnósticos diferenciales clínicos incluyen PV, la EBA, el PMM, el PB, el LEVC, el LES, el eritema multiforme, la necrólisis epidérmica tóxica, y las erupciones ampollosas por drogas.

Microscópicamente, las lesiones de PPN exhiben una combinación de acantólisis suprabasal, como ocurre en el PV, y dermatitis de interfase o liquenoide con queratinocitos apoptóticos (Elmore y col., 2005; Olivry y col., 2000a). En menor medida, pústulas intraepidérmicas con queratinocitos libres como en el PF. La acantólisis no es siempre suprabasal como en el PV, sino que afecta también al estrato espinoso inferior, dejando múltiples capas de queratinocitos en el piso de la separación. Puede haber satelitosis linfocítica de los queratinocitos apoptóticos. La dermis contiene un infiltrado mononuclear mixto de linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y neutrófilos (Gross y col., 2005).

Los diagnósticos diferenciales histopatológicos incluyen el eritema multiforme, el PF y el PV (Gross y col., 2005).

### *Diagnóstico*

Tradicionalmente el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes de la piel de caninos se ha realizado en base a los hallazgos clínicos e histopatológicos. En la actualidad, y con el avance de la tecnología, nuevas técnicas inmunológicas permiten complementar el diagnóstico y, en muchos casos, confirmarlo. La inmunodermatología ha experimentado, en

los últimos años, un gran crecimiento. Se han logrado progresos relevantes en lo que se refiere a nuevos conocimientos y puesta a punto de técnicas de laboratorio cada vez más específicas. En Europa y EEUU se han logrado avances significativos en la patogenia y en el diagnóstico de las dermatosis autoinmunes por medio de la implementación de técnicas inmunológicas como la IFD y la inmunohistoquímica (IHQ), como así también otras técnicas más complejas como la IFI, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunoprecipitación, inmunoblot y western blot. El uso de nuevas técnicas ha permitido reclasificar estas enfermedades que son histológicamente similares pero que tienen una patogénesis diferente. El diagnóstico de las enfermedades del CP en perros se basa en varios criterios, incluyendo anamnesis, signos clínicos, distribución de lesiones, citología, histopatología, IFD, IFI e IHQ (Bedolla y col., 2009; Steeves y col., 2002). En la piel de individuos sanos, la desmogleína se distribuye uniformemente como un patrón finamente punteado en la periferia de los queratinocitos. Por el contrario, tanto la piel lesionada y no lesionada de pacientes con pénfigo puede tener una tinción irregular en la periferia de los queratinocitos y/o en el interior de las células acantolíticas (Steeves y col., 2002) La IFD y la IHQ permiten identificar depósitos intercelulares de IgG, IgM y, frecuentemente, la fracción C3 del complemento (Bedolla y col., 2009). La inmunomarcación permite visualizar estos depósitos rodeando los queratinocitos de las diferentes capas de la epidermis e infundíbulo folicular, como así también en la zona de interfase entre la epidermis y la dermis. En los pacientes con PF, los depósitos se ubican en los estratos

superficiales de la epidermis. En el PV y PPN, los depósitos se encuentran rodeando a los queratinocitos de la capa basal de la epidermis. Finalmente, en el PE se presenta una combinación de depósitos en las capas superficiales de la epidermis y en la zona de interfase, siendo estas ubicaciones similares a las observadas en pacientes con PF y LED respectivamente (Bedolla y col., 2009; Shinya y col., 1996). En un estudio retrospectivo donde se analizaron muestras de piel que presentaban lesiones microscópicas sugerentes de enfermedades del CP y lupus eritematoso (LE), aplicaron técnicas de IHQ, que permitió identificar depósitos intercelulares de IgG canina. La distribución de los depósitos intercelulares de IgG en los espacios de la epidermis, así como de la membrana basal, fue de ayuda para poder diferenciar entre pénfigo y LE, como así también entre las diferentes presentaciones del CP (Bedolla y col., 2009).

La aplicación de técnicas de IFI son utilizadas para la detección de autoanticuerpos circulantes, ya sea en queratinocitos provenientes de cultivos celulares o en diferentes sustratos como piel o mucosas normales. Se ha demostrado que la sensibilidad de la prueba varía según el sustrato utilizado (Honda y col., 2004; Iwasaki y col., 1996; Olivry y col., 2003 y 2009; Yabuzoe, 2009). Otras técnicas, como ELISA se utilizan para detectar IgG circulante frente a Dsg3 en caninos con PF, PV Y PPN (Nishifuji y col., 2009). Las técnicas de inmunoprecipitación, inmunoblot y western blot también han sido utilizadas en el diagnóstico de PV y PPN. Los dominios extracelulares de la Dsg 3 fueron reconocidos por la IgG en el 60% de

sueros de caninos con PV y PPN. La IgG contra los dominios extracelulares de la Dsg 1 se detectó exclusivamente en perros que tenían PV con el fenotipo mucocutáneo (Elmore y col., 2005; Nishifuji y col., 2007 y 2009).

### **Enfermedades ampollares subepidérmicas autoinmunes**

Las EASA son un grupo de enfermedades de la piel que afectan a diversas especies (caninos, felinos, equinos, porcinos y bovinos) y se encuentran asociadas con la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra los componentes de la unión D-E (Favot y col., 2003). Abarca un grupo de entidades que muestran diferencias en los signos clínicos, características microscópicas y respuesta al tratamiento (Olivry y Dunston, 2010). En todas ellas se producen separaciones o hendiduras, dando lugar a la formación de vesículas o ampollas subepidérmicas (Miller y col., 2014).

#### *Diferentes tipos*

Dentro de este grupo de enfermedades se incluyen el penfigoide bulloso, la epidermólisis bullosa adquirida, el penfigoide de las membranas mucosas, y la enfermedad IgA lineal (EAL).

- *Penfigoide bulloso o ampollar*

El PB es un proceso autoinmune poco frecuente, caracterizado por la presencia de vesículas y bullas en piel, mucosas o uniones mucocutáneas de los caninos, felinos y también se ha reportado en los equinos (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016). En esta enfermedad no se ha descrito predilección por sexo (Olivry y Jackson, 2001b). Puede afectar a animales

de cualquier edad, incluso pueden presentar lesiones cutáneas antes del primer año de vida (Olivry y Jackson, 2001b; Olivry y Chan, 2001). Debido a que los animales jóvenes pueden verse afectados, los factores genéticos están probablemente involucrados en la patogénesis de la enfermedad (Olivry y Chan, 2001). Ciertas razas como el Collie, Dachshund y Doberman Pinchers podrían verse más afectadas (Gross y col., 2005).

Los autoanticuerpos, en caninos, son IgG dirigidos contra el antígeno penfigoide bulloso tipo 2 (BPAG2), sección extracelular no colágena (NC16A) del colágeno XVII o BPAG2 (Figura 5) (Miller y col., 2014; Olivry y col., 2000b; Olivry y Chan, 2001). Además, se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias: IL 1, IL5, IL6 e IL8 por parte de los queratinocitos alterados, lo que podría estar relacionado con la separación dermoepidérmica (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

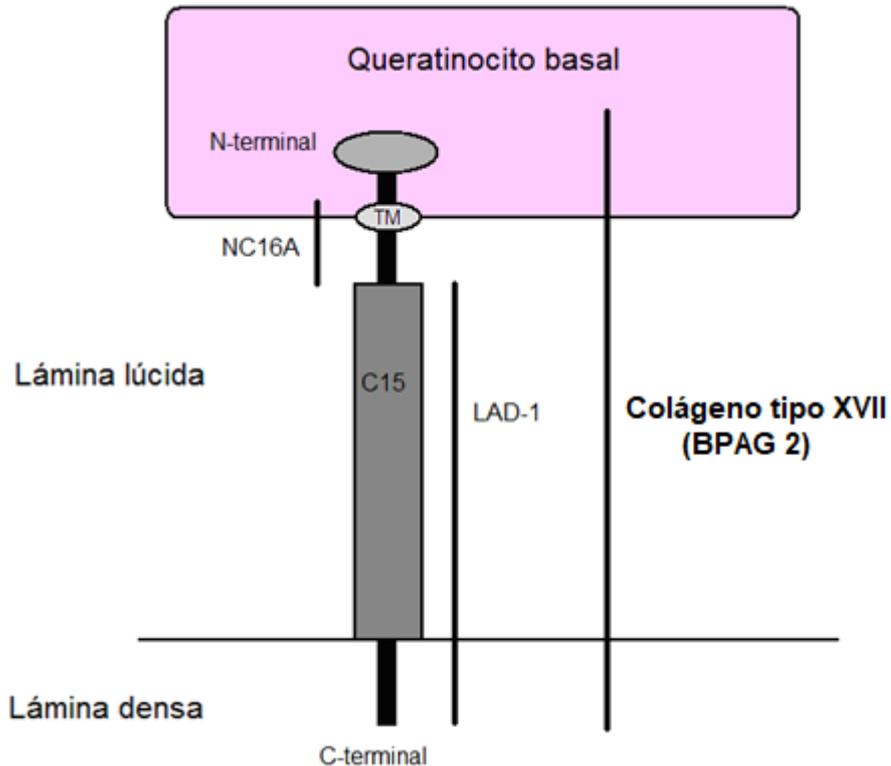
Las lesiones consisten en vesículas y bullas, que progresan a erosiones, úlceras y costras (Iwasaki y col., 1995; Olivry y Chan, 2001). Se localizan en la cabeza, pabellones auriculares y región del dorso y, con menos frecuencia, en las mucosas o las uniones mucocutáneas. Las lesiones progresan y se produce la cicatrización, aunque con frecuencia, se desarrollan nuevas vesículas y ampollas dentro de la cicatriz (Gross y col., 2005).

Los principales diagnósticos diferenciales clínicos incluyen la EBA, el PMM, el LEVC, el PV, el eritema multiforme (Gross y col., 2005), como así también el LES, la necrosis epidérmica tóxica, el linfoma epiteliotrópico, la

candidiasis y numerosas causas de estomatitis ulcerativa canina (Miller y col., 2014).

Microscópicamente se observan de pequeñas a grandes vesículas o bullas que se desarrollan en la unión D-E con la consiguiente formación de hendiduras. Estas lesiones también pueden extenderse al infundíbulo folicular (Gross y col., 2005). En el interior de la bulla se pueden observar abundantes eosinófilos y neutrófilos, a menudo mezclados con fibrina (Gross y col., 2005; Olivry y Chan, 2001). En estas lesiones no hay acantólisis, y el infiltrado inflamatorio en dermis es mixto, compuesto principalmente por eosinófilos, neutrófilos y células mononucleares, variando desde leve a marcado y de ubicación perivascular y/o liquenoide (Gross y col., 2005; Miller y col., 2014).

Los principales diagnósticos diferenciales histopatológicos incluyen la EBA, el PMM, y EAL (Gross y col., 2005, Iwasaki y col., 1995).



**Figura 5:** esquema de la estructura del colágeno tipo XVII (BPAG2)

- *Epidermólisis bullosa o ampollar adquirida*

La EBA al igual que otras EASA, fue clasificada como PB hasta 1995 (Hill y col., 2008). Es una enfermedad que se observa en caninos, se caracteriza por la formación de bullas, con una predisposición mayor en machos que en hembras. La edad media de presentación es de 1 año con un rango de 0,5 a 8 años (Gross y col., 2005; Miller y col., 2014) Los perros de raza Gran Danés son los más afectados, y en algunos estudios se ha sugerido que la endogamia pudo haber sido la causa de la selección de genes que predisponen a la enfermedad en esta raza (Olivry y Chan 2001).

La formación de bullas está asociada con la producción de autoanticuerpos dirigidos contra el colágeno tipo VII (dominio amino-terminal no colágeno

NC1), componente principal de las fibrillas de anclaje dérmico (Bizikova y col., 2015) (Figura 3).

La enfermedad en los caninos se puede presentar de forma generalizada, más frecuente, o localizada donde sólo se ha reportado un caso (Gross y col., 2005; Olivry y Chan, 2001). En la forma generalizada, hay placas eritematosas ubicadas en la región de la cara, la región axilar, abdominal e inguinal. Estas lesiones eritematosas progresan a vesículas que se rompen y provocan ulceración. Se observa, además, erosiones en la mucosa oral y en las uniones mucocutáneas (Gross y col., 2005; Olivry y Chan, 2001; Olivry y Jackson, 2001b). El cuadro se acompaña de hipertermia, letargo, y depresión (Olivry y Chan, 2001; Olivry y Jackson, 2001b). Presenta bacteriemia estafilocócica, anemia y trombocitopenia (Miller y col., 2014; Olivry y Chan, 2001). En la presentación localizada, las lesiones se limitan a la región de la cabeza y el dorso, presentando similares características morfológicas (Olivry y Chan, 2001; Olivry y Jackson, 2001b).

Los principales diagnósticos diferenciales clínicos para EBA generalizado incluyen el PB, el PMM, el LEVC, el PV, el eritema multiforme, y el exantema ampollar (Gross y col., 2005).

Las lesiones microscópicas de EBA son similares en ambas formas de la enfermedad. Hay presencia de bullas subepidérmicas grandes y planas, que incluso pueden contener sangre (Bizikova y col., 2015). Los neutrófilos se acumulan a lo largo de la base o dentro de la separación D-E (Gross y col., 2005). En las lesiones más antiguas de la epidermis se observan úlceras (Olivry y Chan, 2001). En la dermis, la inflamación es de leve a

moderada con presencia de neutrófilos, eosinófilos y un menor número de linfocitos y células plasmáticas, ubicándose en la dermis superficial o perianexal (Gross y col., 2005).

Los diagnósticos diferenciales histopatológicos incluyen el PB, el PMM, EAL y el lupus eritematoso sistémico ampollar tipo 1 (LESA 1) (Gross y col., 2005).

- *Penfigoide de las membranas mucosas*

El PMM, antes llamado penfigoide cicatricial, es una enfermedad ampollar poco frecuente, subepidérmica que afecta las membranas mucosas, uniones mucocutáneas y, con mucho menor frecuencia en zonas de piel con pelo. Se ha reportado en caninos y felinos. La enfermedad se presenta tanto en machos como en hembras. La edad de inicio abarca desde el año y medio hasta los 15 años, pero generalmente se ven afectados perros de edad adulta siendo la edad media para el desarrollo inicial de las lesiones los 5 años. Las razas Husky Siberiano y Pastor Ovejero Alemán presentan una mayor tendencia a padecer PMM (Miller y col., 2014; Olivry y Jackson 2001b; Olivry y col., 2001).

El principal Ag es el BPAG2, adicionalmente BPAG1, integrina  $\alpha 6\beta 4$ , laminina 332 y, raramente, el colágeno tipo VII (Miller y col., 2014; Olivry y col., 2002; Olivry y col., 2010; Tham y col., 2016).

Las lesiones en PMM más frecuentes son erosiones y úlceras, seguido de costras, eritema, vesículas y/o ampollas e hipopigmentación. La simetría es un hallazgo frecuente de encontrar. (Tham y col., 2016) Se ubicaron principalmente en la mucosa de la cavidad oral (encías, paladar duro y

lengua) y en uniones mucocutáneas de la nariz, de los párpados, de los conductos auditivos, del ano y de los genitales externos (Olivry y col., 2001; Olivry y Jackson, 2001b; Tham y col., 2016). Inicialmente, algunos pacientes con PMM pueden presentar despigmentación de las uniones mucocutáneas (Olivry y col., 2001). Cuando las lesiones progresan, es frecuente observar lesiones cicatrizales.

Microscópicamente, las vesículas se observan en la unión D-E, dejando la epidermis intacta. Las lesiones, al igual que en PB, se caracterizan por vesículas con presencia de glóbulos rojos en su interior. Las vesículas o ampollas se encuentran generalmente desprovistas de células inflamatorias. En la dermis superficial hay infiltración de neutrófilos, eosinófilos y, con menor frecuencia, linfocitos y células plasmáticas. La inflamación se vuelve liquenoide en lesiones crónicas (Gross y col., 2005). Los principales diagnósticos diferenciales clínicos e histopatológicos incluyen la EBA, PB, y EAL (Gross y col., 2005).

- *Enfermedad IgA lineal*

La EAL es una dermatosis autoinmune ampollosa subepidérmica poco frecuente, que ha sido descrita en caninos y humanos. La predilección racial, sexual o etaria no ha sido descrita, aunque los escasos reportes dan cuenta de dos casos en caninos, uno macho y otro hembra, de 4 y 3 años de edad, de razas Pastor de Brie y Labrador Retriever respectivamente (Olivry y col., 2000b).

Los autoanticuerpos IgG e IgA se dirigen contra el autoantígeno el segmento extracelular del colágeno XVII procesado (LAD-1) (Figura 5) (Olivry y col., 2000b).

Los caninos con EAL presentan lesiones ulcerativas en la mucosa oral, en la región de la cara y en las almohadillas plantares (Olivry y Chan, 2001). Se afectan también zonas de fricción como la región axilar e inguinal (Gross y col., 2005).

Los diagnósticos diferenciales clínicos incluyen el PMM, el PB, la EBA, el LEVC, el PV, el LES, el eritema multiforme, la necrólisis epidérmica tóxica, y otras erupciones ampollosas a drogas.

En la evaluación microscópica se observan vesículas subepidérmicas, con ausencia de células inflamatorias o con escasos neutrófilos (Olivry y Chan, 2001) y, en ocasiones, presencia de exudado fibrinoso. La inflamación dérmica por debajo de las ampollas es leve e incluye neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (Gross y col., 2005).

Los diagnósticos diferenciales histopatológicos incluyen el PB, el PMM, la EBA (Gross y col., 2005).

### *Diagnóstico*

Para el diagnóstico de las EASA se utiliza la histopatología (Miller y col., 2014). Como técnicas complementarias se utiliza la IHQ que permite detectar la ubicación del colágeno tipo IV. La inmunotinción del colágeno IV sobre la unión D-E puede realizarse sobre muestras de piel con lesiones vesiculares. En estos casos es posible visualizar el colágeno tipo IV en

relación a la hendidura presente, de esta manera se puede determinar el tipo de EASA dependiendo de la localización (Campos Domínguez y col., 2006).

Para la detección de uniones Ag-Ac pueden emplearse las técnicas de IFD e IHQ, que ponen en evidencia depósitos de IgG, IgM o fracción C3 del complemento, los cuales tienen una distribución de tipo lineal en la unión D-E para todas las EASA (Bizikova y col., 2015; Favrot y col., 2003; Iwasaki y col., 1995; Olivry y col., 1999b). Asimismo, en la EAL se observan depósitos de IgA, lo que puede permitir diferenciarla de las otras enfermedades (Olivry y col., 2000b; Olivry y Chan, 2001). Otra técnica que puede utilizarse para la diferenciación de las EASA es la IFI sobre muestras de piel o mucosa normales sometidas a un tratamiento previo con sal (cloruro de sodio) lo que genera una hendidura artificial a nivel de la lámina lúcida. La técnica consiste en enfrentar el tejido con el suero problema a fin de poner en evidencia la localización de los depósitos de autoanticuerpos. Estos se van a unir a la parte superior (lado epidérmico y lámina lúcida), o a la parte inferior (lado dérmico y lámina densa), o bien combinados a ambos lados cuando hay varios antígenos presentes (Hill y col., 2008; Iwasaki y col., 1997; Miller y col., 2014; Olivry y col., 2000b; Olivry y Dunston, 2010). Por último, pueden detectarse autoanticuerpos no solo en piel, sino también en suero y orina, a través de técnicas de IFI, ELISA, inmunoblot e inmunoprecipitación (Campos Domínguez y col., 2006). Las pruebas de anticuerpos antinucleares (ANA) y de Coombs también han sido

utilizadas en el diagnóstico de EBA y LESA 1 (Olivry y col., 1999a; Olivry y col., 2001).

### **Lupus eritematoso**

El lupus eritematoso (LE) representa un espectro de trastornos inflamatorios que varía desde afecciones leves limitadas a la piel hasta enfermedades sistémicas potencialmente mortales como el lupus eritematoso sistémico (LES). El lupus eritematoso cutáneo (LEC) se refiere a los efectos específicos en la piel del LE, independientemente de si existe una afectación sistémica (es decir, poliartritis, glomerulonefritis, trombocitopenia, etc.) (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

La inmunopatogénesis de este grupo de enfermedades no se conoce con claridad. Se sabe que hay formación de complejos Ag-Ac que se adhieren a las células endoteliales de vasos sanguíneos de pequeño calibre (mecanismo de hipersensibilidad tipo III) y a la membrana basal de la piel (LES y LEC) y varios órganos internos (LES). También se han relacionado, en la patogénesis de estas enfermedades, a factores ambientales, agentes virales, factores genéticos, defectos de las células T, hiperactividad de las células B y/o alteraciones hormonales (Balazs Mayanz y Nolasco Espinosa, 2017).

#### *Diferentes tipos*

En medicina veterinaria se puede clasificar al LE en: LES y LEC. El LEC incluye el lupus eritematoso discoide LED (con una forma localizada de

ubicación nasal y una forma diseminada), el lupus eritematoso vesicular cutáneo (LEVC), el lupus eritematoso cutáneo exfoliativo (LECE) y el lupus eritematoso mucocutáneo (LEMC) (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016; Miller y col., 2014).

- *Lupus eritematoso sistémico*

El LES es una enfermedad autoinmune multisistémica y poco común, informada en perros y gatos. El daño tisular puede deberse a depósitos de complejos inmunitarios (hipersensibilidad tipo III), acción citotóxica directa (hipersensibilidad tipo II) o incluso inmunidad mediada por células (hipersensibilidad tipo IV) (Gross y col., 2005).

La enfermedad no presenta predilección sexual ni etárea. Hay una predisposición racial hacia el Pastor Ovejero Alemán (Müller y col., 1997). Las anomalías notificadas en el perro incluyen fiebre de origen desconocido, poliartritis, glomerulonefritis y proteinuria, como así también anemia, trombocitopenia, enfermedad de la piel, neutropenia y enfermedad del sistema nervioso central (Gross y col., 2005). La incidencia de los diferentes signos clínicos es altamente variable (Müller, 1989). Las manifestaciones cutáneas del LES son raras. Las lesiones macroscópicas descritas son extremadamente variables, y van desde una dermatitis seborreica pruriginosa a una lesión de tipo ulcerativa en zonas mucocutáneas. Puede observarse despigmentación, eritema, descamación y alopecia. Las lesiones ocurren más frecuentemente en las regiones expuestas al sol como la cara, las orejas, la nariz y los labios, aunque también pueden observarse lesiones en la piel delgada, ligeramente

pigmentada y con poco pelo, de otras regiones del cuerpo (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016; Miller y col., 2014). Generalmente las lesiones observadas presentan simetría. En la bibliografía se reporta un caso de un canino, Bichon Frise, con vesículas y úlceras, asociadas a anemia, trombocitopenia, neuritis, hepatitis y proteinuria sugestiva de glomerulonefritis. En este estudio, se observó circulación de Ac anti-membrana basal, que tenían como blanco el dominio NC1 del colágeno tipo VII (Miller y col., 2014; Olivry y col., 1999a).

Los principales diagnósticos clínicos diferenciales, en relación a los signos dermatológicos del LES, son el LED, las EASA, los trastornos de la cornificación, las vasculitis y la paniculitis nodular estéril idiopática.

La histopatología del LES consiste en una dermatitis de interfase liquenoide caracterizada por un infiltrado linfocítico en la unión D-E y degeneración hidrópica de células del estrato basal, y que en ocasiones estos cambios pueden presentarse también en el folículo piloso (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016; Miller y col., 2014). Asimismo, es frecuente observar apoptosis de los queratinocitos basales, incontinencia pigmentaria y degeneración vacuolar subepidérmica. (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016; Olivry y col., 1999a).

Los principales diagnósticos diferenciales histopatológicos son los diferentes tipos de lupus y el eritema multiforme (Gross y col., 2005).

- *Lupus eritematoso cutáneo*

Lupus eritematoso discoide

El LED es frecuente en caninos y raramente descrito en equinos. Puede tener una forma localizada, que se observa en el plano nasal y una forma diseminada (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

La forma localizada que se observa en caninos, es una enfermedad cutánea autoinmune benigna en la cual las manifestaciones sistémicas están ausentes. Se ha observado que esta afección es más común en los climas soleados y cálidos, lo que refleja la posibilidad de que la exposición a la luz ultravioleta agrave o desencadene la enfermedad (Miller y col., 2014). Es probable que algunos perros diagnosticados previamente con dermatitis solar nasal o "nariz de collie" en realidad podrían haber estado cursando un LED (Gross y col., 2005).

En el LED no se ha reportado predilección sexual. Puede afectar a perros entre los 2,5 y 11 años de edad. Afecta con mayor frecuencia a razas dolicocefalas como el Collie de pelo largo, Pastor de Shetland, Husky Siberiano, Pastor Australiano, Pastor Ovejero Alemán y sus cruces, lo que podría sugerir una predisposición genética (Balazs Mayanz y Nolasco Espinosa y col., 2017; Gross y col., 2005).

Inicialmente se presenta despigmentación, eritema, descamación y una pérdida de la arquitectura normal de la nariz. Con la cronicidad, las lesiones pueden extenderse hacia el puente de la nariz, haciéndose más profundas para incluir erosión, ulceración y formación de costras. Las lesiones pueden observarse, con menos frecuencia, en las regiones perioculares, los pabellones auriculares o la zona de los genitales externos (Wiemelt y col., 2004).

Los principales diagnósticos diferenciales clínicos son el LES, la piodermia mucocutánea, las dermatofitosis, el PF, el PE, el vitíligo y el síndrome Vogt-Koyanagi-Harada. (Gross y col., 2005).

Los hallazgos histopatológicos presentes en el LED canino consisten en una dermatitis de interfase rica en linfocitos todo a lo largo de la unión D-E, en los folículos pilosos y en las glándulas anexas. Sin embargo, este infiltrado puede variar de ser principalmente linfocítico a linfoplasmocitario y, en algunos casos principalmente plasmocitario. (Wiemelt y col., 2004). Cuando la inflamación oscurece la unión D-E, se la denomina "interfase liquenoide" y a menudo se acompaña de degeneración vacuolar de células basales (Gross y col., 2005). Puede observarse apoptosis de queratinocitos basales (cuerpos de Civatte) como así también, en las células del estrato espinoso, sateliosis linfocítica (Gross y col., 2005). A menudo hay marcada incontinencia pigmentaria, exocitosis linfocítica y engrosamiento focal de la membrana basal (Wiemelt y col., 2004). Puede observarse una separación dérmica-epidérmica "artificial" en los márgenes de las muestras histopatológicas. Este artefacto es debido a que el tejido debilitado, a través de la unión D-E, se separa de esta manera durante el procesamiento y, en consecuencia, resulta en un "artefacto útil de Stannard" evidenciando el daño en la interfase (Gross y col., 2005). La epidermis suele estar hiperplásica, pero puede tener áreas focales de atrofia. Puede haber mucinosis dérmica y epidérmica (Wiemelt y col., 2004), observándose, en casos severos, erosión o ulceración secundaria, pústulas superficiales, costras y acantosis moderada (Gross y col., 2005).

Los principales diagnósticos diferenciales histopatológicos incluyen a los otros tipos de LE y la piodermia mucocutánea, principalmente cuando el cuadro de LED es crónico (Gross y col., 2005).

La forma diseminada de lupus eritematoso discoide ha sido descrita en dos caninos. En ambos casos se observaron lesiones similares a las descritas en la forma localizada, pero con un patrón de distribución cutáneo generalizado, con compromiso de la piel y los folículos pilosos (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

#### Lupus eritematoso vesicular cutáneo

Es un desorden cutáneo comúnmente denominado dermatosis ulcerativa idiopática, que ha sido reportada en algunas razas caninas. El inicio del cuadro suele suceder durante los meses de verano o bien exacerbarse durante estos meses, lo que sugiere también la participación de los rayos ultravioleta en su patogenia (Balazs Mayanz y Nolasco Espinosa y col., 2017; Jackson, 2004; Müller y col., 1997).

El LEVC se ha reportado tanto en machos como en hembras, y tiende a afectar a perros adultos (promedio 5 años). Afecta a ciertas razas caninas como Pastor de Shetland y Rough Collie. Clínicamente el LEVC se caracteriza por úlceras anulares, policíclicas y serpiginosas, que comprometen las zonas corporales de poco pelo, específicamente se ubican en el vientre, la ingle, medial de muslos y axilas (Jackson, 2004; Miller y col., 2014). A menudo pueden afectarse las uniones mucocutáneas, la superficie cóncava de los pabellones auriculares, la mucosa bucal y las almohadillas plantares (Balazs Mayanz y Nolasco Espinosa y col., 2017).

Los diagnósticos diferenciales clínicos son el PB, la hidradenitis supurativa, eritema multiforme, LES y PV (Gross y col., 2005).

Las características histológicas son de una dermatitis de interfase linfocítica con degeneración hidrópica de células basales, apoptosis de queratinocitos y extensas vesículas y bullas a lo largo de la unión D-E que suele terminar en áreas de ulceración (Balazs Mayanz y Nolasco Espinosa y col., 2017; Jackson, 2004; Miller y col., 2014).

Los principales diagnósticos diferenciales histopatológicos incluyen al eritema multiforme, la dermatomiositis y a los diferentes tipos de lupus (Gross y col., 2005).

#### Lupus eritematoso cutáneo exfoliativo

Esta enfermedad se ha reportado solamente en el Braco Alemán de pelo corto. Inicialmente se fue descrita como dermatosis hereditaria lupoide del Braco Alemán de pelo corto, pero luego se denominó LECE, por su semejanza con una forma exfoliativa de lupus eritematoso cutáneo en humanos, y porque el patrón histopatológico predominante es una dermatitis de interfase. A través de estudios genéticos se confirmó la naturaleza hereditaria de la enfermedad. El LECE se manifiesta en perros jóvenes entre 6 meses y 1 y medio de vida (Wang y col., 2011).

Los perros afectados desarrollan descamación extensa con alopecia y presencia de cilindros foliculares, despigmentación gradual, erosiones y úlceras. Las lesiones se inician generalmente en la cara (hocico), pabellones auriculares y dorso, y luego se generalizan hasta afectar el vientre y las extremidades. Los puntos de presión y el escroto pueden verse

afectados de forma severa y el prurito puede o no estar presente. Se han descrito casos con linfadenopatías periféricas y pirexia (Balazs Mayanz y Nolasco Epinosa y col., 2017; Bryden, 2005; Miller y col., 2014). Progresivamente los perros demuestran letargia, cojeras y alteraciones hematológicas como trombocitopenia y anemia y, en casos avanzados, nefritis leve a moderada (Bryden, 2005; Wang, 2011).

Los diagnósticos diferenciales clínicos incluyen seborrea primaria, ictiosis y adenitis sebácea. (Gross y col., 2005).

Las características histológicas son específicas del lupus, se presenta una dermatitis de interfase linfocítica que suele extenderse hasta el infundíbulo de los folículos pilosos como una foliculitis mural (Bryden y col., 2005; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016; Miller y col., 2014). Una lesión característica es la degeneración vacuolar severa de la epidermis, acompañada de apoptosis. (Gross y col., 2005). Adicionalmente se pueda observar una intensa hiperqueratosis ortoqueratótica y presencia de linfocitos alrededor de las glándulas sebáceas que resulta en destrucción de las mismas (Bryden y col., 2005; Gross y col., 2005; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016; Miller y col., 2014).

Los diagnósticos diferenciales histopatológicos con la adenitis sebácea, otras formas de lupus y el eritema multiforme (Gross y col., 2005).

#### Lupus eritematoso mucocutáneo

En 2015 se describió una nueva variante del LEC, el LEMC. (Olivry y col., 2015). Se realizó un estudio sobre 21 perros que presentaban diagnóstico histopatológico de LEC. La enfermedad afecto mayormente a hembras y a

perros de edad adulta. Más de la mitad de los perros fueron Pastores Ovejeros Alemanes o sus cruza. Las lesiones clínicas descritas fueron erosiones y úlceras en las zonas genital, perigenital y anal, con menor frecuencia se vieron afectadas las zonas perioculares y perianales. (Olivry y col., 2015).

En la histopatología se observó dermatitis linfocítica de interfase que incluyó apoptosis de queratinocitos basales y cambios hidrópicos. Se evidenció engrosamiento de la membrana basal, apoptosis de queratinocitos suprabasales y sateliosis linfocítica (Olivry y col., 2015).

### *Diagnóstico*

El diagnóstico de lupus se basa en la anamnesis, el examen clínico y los resultados histopatológicos. En la histopatología se observa una dermatitis de interfase en la unión D-E de tipo liquenoide con degeneración hidrópica y apoptosis de queratinocitos de las capas basales de la epidermis e incontinencia pigmentaria. En el caso del LES, la variada gama de signos clínicos puede tener una amplia lista de posibles causas y diagnósticos diferenciales. Para ello se requiere realizar un perfil bioquímico, hemograma completo y uroanálisis. La prueba de anticuerpos anti-nucleares (ANA) por inmunofluorescencia es positiva en el 85% al 90% de los casos de LES. En el LED la prueba de ANA resulta negativa en el 95% de los pacientes, y de resultar positiva podría ser indicativo de una potencial conversión a LES, por lo que se recomienda control y seguimiento del paciente. En los casos de LECE y LECV donde se aplicó la prueba de ANA

la misma también resultó negativa (Jackson y col., 2004). La IFD y la IHQ en el LED revelan depósitos lineales de Igs y complemento en la unión D-E conocida como banda de lupus. Las pruebas de IFD e IHQ en pacientes con LECE revelaron depósitos de Igs en la unión D-E y, en algunos casos, en la membrana basal folicular (Balazs Mayanz y Nolasco Espinosa, 2017, Bryden, 2005). En un estudio realizado en casos de LECV se aplicó una técnica de IHQ que permitió identificar un infiltrado compuesto principalmente por linfocitos CD8<sup>+</sup> en la epidermis y CD4<sup>+</sup> en la dermis (Jackson y col., 2004). Conjuntamente se realizó la prueba de IFD, que resultó positiva en el 50% de los casos estudiados, y puso en evidencia áreas focales o difusas de depósitos de IgG en la zona de membrana basal. (Jackson y col., 2004)

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

- a. La identificación de patrones histopatológicos, inmunohistoquímicos y lectinhistoquímicos de lesiones cutáneas permiten establecer el diagnóstico definitivo en las dermatosis inmunomediadas.
  
- b. La identificación y caracterización de los patrones histopatológicos, inmunohistoquímicos y lectinhistoquímicos de lesiones cutáneas permite establecer relación con la presentación clínica en los diferentes tipos de dermatosis inmunomediadas.

## **OBJETIVOS GENERALES**

- a. Establecer bases clínicas, histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas para el diagnóstico de las dermatosis caninas que incluyan mecanismos inmunológicos.
  
- b. Evaluar clínicamente al paciente y establecer relaciones entre la presentación clínica, las lesiones histopatológicas y los resultados obtenidos en las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

## ESTUDIO RETROSPECTIVO

### Objetivos

- Realizar un relevamiento de las dermatosis inmunomediadas (DI) han ingresado al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria en los últimos 10 años.
- Identificar patrones histopatológicos y lectinhistoquímicos que permitan caracterizar las diferentes lesiones cutáneas inmunomediadas.
- Poner a punto y desarrollar técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia para el diagnóstico de DI.

## **Estudio anatomopatológico**

El estudio histopatológico resulta una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes porque permite, generalmente, arribar a un diagnóstico definitivo. Las dermatosis autoinmunes en caninos comprenden las enfermedades caracterizadas por pústulas, vesículas o ampollas como lesión primaria que incluye al CP (PF, PE, PV y PPN) y las EASA (PMM, PB, EBA y EAL). Asimismo, también se comprenden los diferentes tipos de LE (LES, LED, LECE, LEVC y LEMC) que se caracterizan por degeneración vacuolar del estrato basal e infiltración inflamatoria en la unión D-E, entre otras lesiones microscópicas. En esta primera parte se realizó la descripción e interpretación macro y microscópica de las lesiones en los casos seleccionados cuyo diagnóstico fue de enfermedad autoinmune. La evaluación de las historias clínicas permitió el establecimiento de los patrones de las lesiones macroscópicas y los patrones de las lesiones microscópicas fueron obtenidos de los informes histopatológicos y reevaluación de las muestras seleccionadas.

### **Materiales y métodos**

Se evaluaron los registros del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. Bernardo Epstein, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, durante un periodo de 10 años comprendido entre los años 2004 y 2014. El material estudiado se corresponde con muestras de piel de caninos que fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en bloques de parafina, posteriormente cortadas con microtomo (5µm de espesor) y

coloreadas con Hematoxilina & Eosina. Se seleccionaron los casos cuyo diagnóstico histopatológico fue de “enfermedad autoinmune”, que incluyó las diferentes enfermedades descritas anteriormente. A partir de las historias clínicas se recopilaron los siguientes datos de los pacientes: raza, edad, sexo, signos clínicos, lesiones cutáneas y sus ubicaciones anatómicas específicas. Mediante el análisis de las historias clínicas se pudieron registrar en planillas de cálculo las lesiones primarias y secundarias. Se realizó una nueva observación de los cortes histológicos con el fin de caracterizar, registrar y clasificar las lesiones microscópicas de la epidermis, la unión D-E y la dermis.

### **Estudio inmunohistoquímico**

La IHQ es una herramienta que, al combinar técnicas histopatológicas, inmunológicas y bioquímicas, permite localizar componentes tisulares definidos "*in situ*", mediante el empleo de anticuerpos específicos y de moléculas marcadoras. Todos los métodos de IHQ se basan en la conjugación de distintos marcadores con moléculas de Igs. Luego de producida la unión Ag-Ac se coloca el marcador, el cual es localizado de diversas maneras, generalmente por una reacción tintorial, y de ese modo logramos detectar en que estructuras se localiza el Ag problema. En el presente trabajo, al tratarse de enfermedades autoinmunes en la piel, el Ag problema es propio siendo la misma IgG el componente a detectar por lo cual se utilizó una anti-IgG de canino como Ac primario. Mediante el estudio inmunohistoquímico se logró evaluar los patrones de inmunomarcación en

las diferentes dermatosis autoinmunes, como así también poder caracterizar el sitio de inmunomarcación. Además, se pudo determinar si hubo o no diferencias de inmunomarcación entre las diferentes enfermedades, siendo este resultado importante a la hora de formular el diagnóstico final.

#### Materiales y métodos

Del total de casos registrados en el estudio retrospectivo (n=74), la técnica de IHQ fue aplicada a 61 casos. En los restantes 13 casos la técnica no fue aplicada porque el material era insuficiente y en muchos casos no se contaba con material de reserva.

Se le realizaron cortes en vidrios positivados y se aplicó una técnica de IHQ que fue el método Steptavidina-Biotina-Peroxidasa (LSAB 2HRP® (DakoCytomation, California, USA). Como anticuerpo primario se utilizó una anti-IgG canina comercial elaborada en conejo (AffinePure Rabbit Anti-Dog IgG, FC Fragment Specific. Lab. Jackson immunoresearch cód: 304-005-008) Como método de revelado se utilizó DAB (DakoCytomation, California, USA). La técnica completa esta descripta en Anexo I.

Se utilizaron como controles negativos cortes de piel normal, de diferentes regiones de caninos sin lesiones cutáneas. Las muestras controles fueron obtenidas a través de punch 6 u 8 mm o bien, por medio de bisturí. Como control positivo se utilizó un corte de linfonódulo de un canino con hiperplasia linfoide. El fundamento de utilizar el linfonódulo se basó en que las células plasmáticas, presentes en gran número en la médula del

linfonódulo, contienen abundante cantidad de IgG, resultando positivas a la inmunomarcación. Luego de la puesta a punto de la técnica, los controles positivos fueron los cortes de piel con diagnóstico histopatológico de LED. Muchos de los cortes histopatológicos con LED presentan a nivel de la unión D-E un infiltrado inflamatorio abundante denominado infiltrado liquenoide. Este infiltrado es principalmente de tipo linfoplasmocitario, que incluye un gran número de células plasmáticas. Los cortes con esta característica fueron incluidos como control positivo durante el desarrollo de la técnica.

### **Estudio Lectinhistoquímico**

En medicina veterinaria, las técnicas de lectinhistoquímica (LHQ) se han utilizado a fin de estudiar la variación en la presentación y distribución de los hidratos de carbono tanto en tejidos animales normales como patológicos, y sus efectos en la fisiología celular (Massone y col., 1991; Paolicchi y col., 1995; Suter y col., 1991). Los carbohidratos se hallan ampliamente distribuidos en los tejidos animales. Las membranas celulares contienen glicoconjugados en la forma de glucolípidos o glicoproteínas. Los avances en el conocimiento de la localización, síntesis y funciones de los glicoconjugados se han basado en el desarrollo de técnicas que han permitido una mejor caracterización, purificación y análisis estructural de los componentes hidrocarbonatos.

En los caninos, la técnica se ha aplicado en la piel de cachorros y adultos, así como también, sobre la piel de las almohadillas plantares (Meyer y

Tsukise, 1995; Miyazawa y col., 1994). Los patrones de unión de las diferentes lectinas a los queratinocitos dependen del estado funcional y del grado de diferenciación de las células (Desantis y col., 2003).

Las fracciones de carbohidratos de la membrana celular están involucradas en funciones como la interacción entre células y se cree que son importantes en una variedad de funciones celulares. Asimismo, las lectinas biotiniladas y complejo avidina-biotina-peroxidasa se han utilizado para estudiar la correlación entre la expresión de glicoconjugados celulares y la maduración escamosa tanto en la piel normal de caninos, así como en diversas neoplasias epiteliales (Castagnaro y Canese, 1991).

En el presente estudio se aplica una técnica LHQ con el fin de evaluar si hay diferencias en los patrones lectinhistoquímicos hallados en la piel normal de canino en relación a los observados en la piel con lesiones autoinmunes y, a su vez, poder observar si hay diferencias entre las enfermedades con el fin de poder complementar los patrones de lesión útiles para el diagnóstico.

#### Materiales y métodos

Se trabajó con muestras de piel normal y con lesión. Se seleccionaron 3 casos de LED, PF y PE y 2 casos de PV. A estos cortes se les aplicó la técnica de LHQ para la cual se utilizaron 7 lectinas biotiniladas (Vectastain Elite, Vector Lab Inc., Burlingame, CA, USA) (Tabla 1). En la tabla 1 se observa el nombre de cada lectina, la abreviación específica, el grupo de los carbohidratos por los que tiene afinidad y la concentración de trabajo

utilizadas. Se empleó el método de streptavidina-biotina-peroxidasa (LSAB 2HRP® (DakoCytomation, California, USA). Como método de revelado se utilizó DAB (DakoCytomation, California, USA). y luego se realizó una coloración de contraste con hematoxilina (Anexo II).

**Tabla 1:** lectinas utilizadas durante el desarrollo de la técnica.

Lectina	Acrónimo	Oligosacárido específico	Concentración
<b>Grupo I:</b> glucosa/manosa (Glc-Man)			
Concavalia ensiformes	Con A	$\alpha$ -D-Man; $\alpha$ -D-Glc	30 $\mu$ m/ml
<b>Grupo II:</b> N-acetil-glucosamina (GlcNac)			
Triticum vulgare	WGA	$\beta$ -D-GlcNAc, NeuNAc	30 $\mu$ m/ml
<b>Grupo III:</b> N-acetil-galactosamina (GalNAc)			
Glycine max	SBA	$\alpha$ , $\beta$ -D-GalNAc, $\alpha$ , $\beta$ -D-Gal	30 $\mu$ m/ml
Dolichos biflorus	DBA	$\alpha$ -D-GalNAc	30 $\mu$ m/ml
Arachis hypogaea	PNA	$\beta$ -D-Gal, $\beta$ 1-3-D-GalNAc	10 $\mu$ m/ml
Ricinus communis	RCA	$\beta$ -D-Gal	30 $\mu$ m/ml
Ulex europaeus	UEA I	$\alpha$ L-Fuc	30 $\mu$ m/ml

## **ESTUDIO PROSPECTIVO**

### **Objetivo**

Evaluar clínicamente al paciente y establecer relaciones entre la presentación clínica, las lesiones histopatológicas y los resultados obtenidos en las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

## **Estudio clínico y anatomopatológico**

El estudio clínico consistió en el examen físico y la evaluación dermatológica de los pacientes ingresados al consultorio externo del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Luego de establecido el diagnóstico clínico/dermatológico y seleccionado los casos, se procedió a la toma de muestra y evaluación histopatológica de piel de los animales seleccionados.

El examen físico y la evaluación dermatológica de los pacientes es la parte del examen que resulta fundamental porque permite arribar a un diagnóstico clínico. En este sentido, nos va orientando en los pasos a seguir como así también nos va a permitir llevar a cabo un tratamiento y establecer un pronóstico de la enfermedad. La correcta descripción de las lesiones macroscópicas observadas, su extensión y ubicación permiten establecer una lista de posibles diagnósticos presuntivos y seleccionar el o los métodos complementarios de diagnóstico específicos que podemos aplicar en cada enfermedad. La evaluación clínica debe ser precedida por una correcta reseña y anamnesis. A su vez, en el caso de las dermatosis autoinmunes, un correcto examen dermatológico permitirá una adecuada toma de muestras y facilitará el trabajo del patólogo en la descripción de las lesiones microscópicas y el arribo a un diagnóstico definitivo.

## **Materiales y métodos**

El estudio prospectivo se realizó entre los años 2015 y 2018. Los casos se obtuvieron del Hospital Escuela Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP,

en el Consultorio Externo Dermatológico. Se incluyeron en este estudio 19 pacientes con lesiones orientativas de dermatosis autoinmune. Los mismos se seccionaron por los siguientes datos: reseña, anamnesis y observación clínica. Para la identificación de los pacientes con enfermedad autoinmune se tuvo en cuenta la presentación clínica y evolución del cuadro, las lesiones primarias y secundarias presentes en la piel, el compromiso de las uniones mucocutáneas y las mucosas, así como también la distribución, localización y extensión de las lesiones (Tabla 2).

A los pacientes seleccionados se les realizó un examen clínico general y dermatológico. Los datos obtenidos fueron volcados en planillas de cálculo y se realizaron dermogramas con el objetivo de caracterizar a la enfermedad desde el punto de vista dermatológico (Anexo III).

A todos los pacientes se les realizó una biopsia de piel para el estudio histopatológico, que incluyó zonas con lesión y sin lesión. Las muestras fueron obtenidas, según su ubicación, con anestesia local (Anexo IV), en los casos que fue posible, y por medio de un punch de 6 u 8 mm. En otros casos se tuvo que realizar anestesia general (Anexo V) y las muestras fueron obtenidas por medio de bisturí o punch. Las muestras se fijaron en formol neutro al 10% por un periodo de tiempo no mayor a 48 horas y se procesaron mediante las técnicas de rutina en el Laboratorio de Patología Especial Veterinaria. En todos los casos se arribó a un diagnóstico histopatológico basado en la interpretación de las lesiones microscópicas observadas (Tabla 2).

**Tabla 2:** reseña de los pacientes, tipo y ubicación de las lesiones. Periodo 2015-2018.

<b>Año</b>	<b>Reseña</b>	<b>Tipo de lesiones cutáneas</b>	<b>Ubicación de las lesiones</b>	<b>Histopatología</b>
<b>2015</b>	Doberman-macho-8 años	Úlceras	Encía	EASA
	Collie-hembra-9 años	Pápulas, costras	Puente nasal, cuello, dorso-lomo y miembros	LED
	Mestizo-hembra-4 años	Costras	Puente nasal, reg. periocular, tórax, miembros.	PV
	Collie-macho-4 años	Costras, úlceras	Puente nasal	LED
	Collie-macho-8 meses	Eritema, hiperqueratosis, alopecia e hiperpigmentación	Espacios interdigitales y cara	PF
<b>2016</b>	Doberman-macho-9 años	Costras, descamación	Puente nasal y reg. periocular	LED
	O. belga-macho-6 años	Costras, descamación, úlceras	Puente nasal	LED
	Mestizo-hembra-5 años	Úlceras y despigmentación	Ollares y labio	LED
	Dogo-hembra-5 años	Úlceras, costras, erosiones	Dorso-lomo	EASA
	Mestizo-hembra-4 años	Costras, erosiones	Puente nasal	LED
<b>2017</b>	Mestizo-macho-5 años	Alopecia y úlceras	Puente nasal y reg. periocular	PE
	Caniche-hembra-3 años	Úlcera	Unión MC de labio	EASA
	Pitbull-hembra-5 años	Alopecia	Nariz	EASA
	Mestizo-hembra-3 años	Despigmentación y descamación	Ollares y unión MC, puente nasal	PE
<b>2018</b>	Mestizo-macho-10 años	Úlceras	Cavidad. bucal, párpado, miembros	PE
	Mestizo-macho-1 ½ años	Úlceras y pústulas	Puente nasal y reg. periocular	PF
	Collie-hembra-4 años	Erosiones, úlceras, eritema, despigmentación, costras	Ollares, puente nasal	EASA
	Weimaraner-macho-9 años	Alopecia, despigmentación, costras	Puente nasal y nariz	EASA
	Collie-macho-2 años	Úlceras	Cavidad. bucal., abdomen, reg. inguinal y axilar	LED

## **Estudio inmunohistoquímico**

### **Materiales y métodos**

Se aplicó la misma técnica de IHQ que en el estudio retrospectivo (ver Anexo 1) solo que en este caso la técnica se aplicó a 13 casos de CP y LE. En los casos de EASA no se realizó la IHQ pues no hay diferencias entre estas enfermedades y sus patrones de inmunomarcación ya que en todos los casos las lesiones microscópicas se ubican en la unión D-E.

### **Técnica de inmunofluorescencia**

La técnica de inmunofluorescencia (IF) utiliza la capacidad de ciertas sustancias que, al ser excitadas por la luz ultravioleta, emiten un haz de luz de mayor longitud de onda, que se visualiza con un microscopio de fluorescencia. Cuando estas sustancias se combinan con Igs (Ac) permiten detectar la presencia de Ag o Ac en una muestra problema.

La IHQ y la IF son técnicas ampliamente utilizadas en el campo de la patología, ya sea para el diagnóstico de enfermedades específicas, o bien para conocer la expresión de una determinada proteína, por ejemplo, en un tumor específico, posibilitando tener un impacto en el pronóstico o en la implementación de una terapéutica. Tradicionalmente la IF ha sido utilizada en tejidos criopreservados, mientras que la IHQ en tejidos fijados e incluidos en parafina. Sin embargo, existe otra técnica poco conocida la cual combina ambas técnicas y es conocida como inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina (IF-P). Esta técnica, al igual que

la IHQ y la IF, tiene por objetivo, localizar los antígenos a través de la unión Ag-Ac en tejido fijado e incluido en parafina (Parra-Medina y Polo, 2017). La técnica utilizada en este nuestro trabajo fue la de IF-P directa y se utilizó como Ac primario una anti-IgG canina marcada con fluoresceína (Anti-Dog IgG (whole molecule) Sigma®. Código F4012). Al igual que con la técnica de IHQ, la anti-IgG se une específicamente a la IgG presente en la piel de caninos con enfermedades autoinmunes.

### *Materiales y métodos*

La técnica de IF-P se aplicó en casos de: PF, PE, PV y LED, que se presentaron a consulta en el Hospital Escuela durante el estudio prospectivo (año 2015-2018). Los mismos se seleccionaron en base al examen clínico, al dermograma y el diagnóstico histopatológico. A partir del material incluido en parafina se realizaron cortes de 5 $\mu$ , y fueron procesados para realizar la técnica de IF-P que consistió en la aplicación de un anticuerpo anti-IgG canina marcada con fluoresceína (Anti-Dog IgG (whole molecule) Sigma®. Código F4012) con una dilución 1/50 (Anexo VI) en los cortes de piel. Se utilizó como control negativo un corte de piel al que se le reemplazo la anti-IgG marcada con fluoresceína por buffer fosfato salino (PBS, abreviatura del inglés, phosphate buffered saline). Como control positivo se utilizó un corte de linfonódulo de canino con hiperplasia linfoide, resultando positivas las células plasmáticas de la médula.

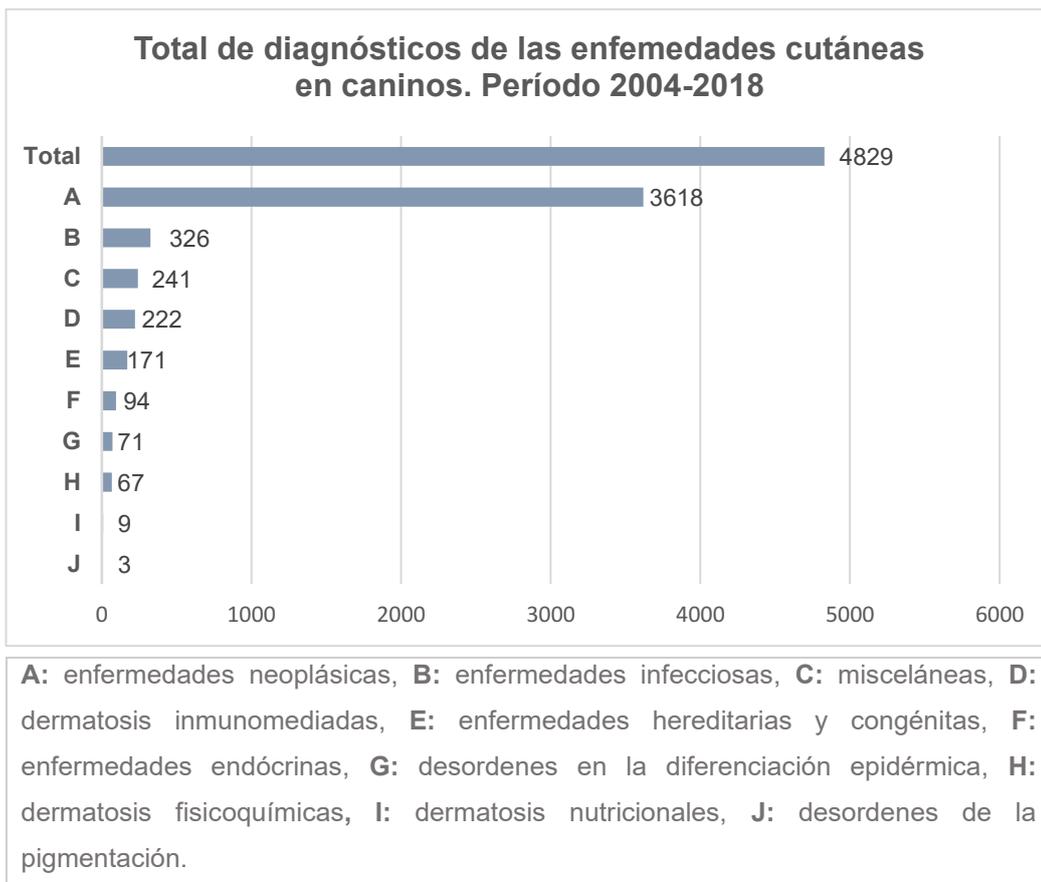
En simultáneo con la fluoresceína se utilizó el 4',6-diamidino-2-dihidrocloruro fenilindol (DAPI) (Invitrogen Life Technologies, Eurogene,

OR, USA) que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) permitiendo evidenciar los núcleos celulares. La utilización del DAPI nos permitió una mejor localización de la inmunomarcación con fluoresceína en el tejido. Este marcador se detecta a través de un filtro de luz azul o cian con el microscopio de fluorescencia (Microscopio de luz UV Nikon Optiphot® con lámpara de luz halógena).

## RESULTADOS

### *Enfermedades de la piel*

Las diferentes enfermedades que afectan a la piel de los caninos pueden clasificarse de acuerdo a su mecanismo patogénico de lesión en: enfermedades congénitas y hereditarias, desordenes de la diferenciación epidérmica, desordenes de la pigmentación, daños fisicoquímicos, deficiencias nutricionales, enfermedades endocrinas, dermatosis inmunomediadas, enfermedades infecciosas (virales, bacterianas, fúngicas, protozoarias, ectoparásitos artrópodos y helmintos), neoplásicas y misceláneas. Durante el periodo del estudio retrospectivo y prospectivo (2004-2018) ingresaron al Laboratorio de Patología Especial un total de 4829 muestras de piel provenientes de caninos con historia clínica de enfermedad cutánea. Teniendo en cuenta la clasificación anteriormente planteada, del total de muestras ingresadas el mayor porcentaje fue para las neoplasias cutáneas, con el 74,92% (n=3618). Las DI (n=222) se dividieron en dos grupos, los trastornos de hipersensibilidad (n=129) y las enfermedades autoinmunes (n=93) representando estas últimas el 1,93% de los casos estudiados (Figura 6).



**Figura 6:** total de diagnósticos histopatológicos de enfermedades cutáneas en caninos realizadas por el Laboratorio. Período 2004-2018.

### *Diagnóstico histopatológico de enfermedades autoinmunes*

El diagnóstico histopatológico de las enfermedades autoinmunes en piel obtenidos durante el estudio retrospectivo y prospectivo permitió el análisis microscópico detallado y posibilitó obtener patrones de lesión comunes a cada enfermedad. Se utilizó como referencia en este análisis el texto: *“Enfermedades de la piel del perro y el gato: diagnóstico clínico e histopatológico de Gross y col., 2005”*.

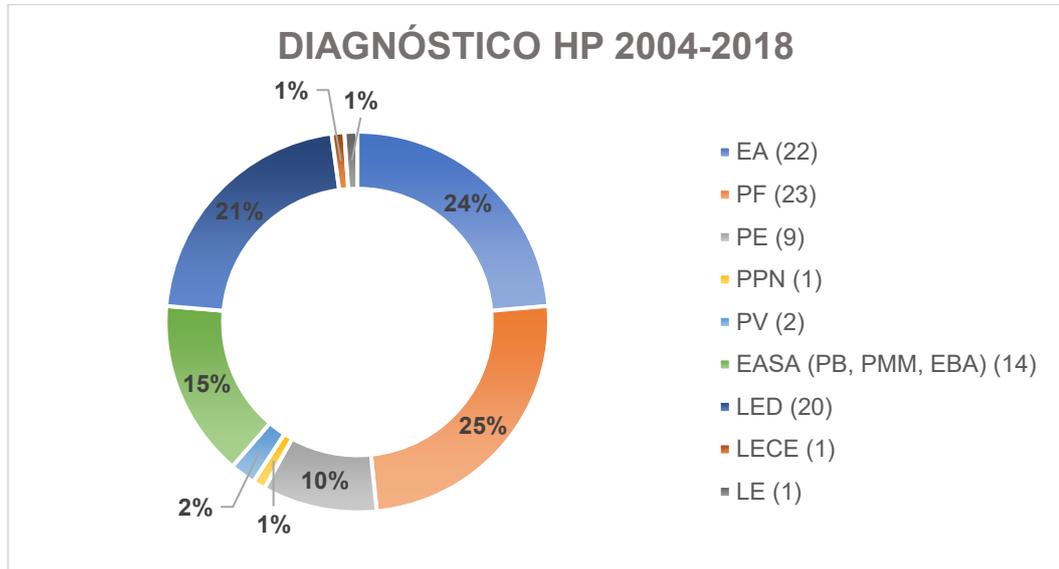
En la figura 7 se presentan las diferentes enfermedades autoinmunes diagnosticadas mediante el estudio histopatológico.

En la Tabla 3, se presentan los casos con diagnóstico histopatológico y la comparación de los resultados obtenidos mediante la histopatología (HP) sola y la HP más la IHQ (n=93). En la categoría enfermedad autoinmune inespecífica (EIA), se incluyen todos aquellos casos en los cuales no fue posible identificar el tipo de enfermedad autoinmune tanto en el estudio histopatológico como como así también cuando se aplicó la IHQ. Podemos observar que en los resultados obtenidos por ambas técnicas el número de diagnósticos de EAI disminuye de 22 a 14 (8.65%).

En el análisis del estudio anatomopatológico se trabajó con los resultados obtenidos en la HP y la IHQ combinadas, y se establecieron categorías en relación a los diagnósticos obtenidos, siendo n=79 (Tabla 4). De esta manera, en el análisis estadístico, se agruparán a las enfermedades de la siguiente forma:

- CP: PF, PE, PV y PNP
- LUPUS: LED, LECE, LE

- EASA: PB, EBA y PMM



**Figura 7:** enfermedades autoinmunes diagnosticadas por histopatología en el Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. *B Epstein*. Período 2004-2018 (n=93).

**Tabla 3:** resultados obtenidos por HP en comparación con los obtenidos con HP y la aplicación de la técnica IHQ (n=93).

Enfermedades	Diagnóstico HP 2004-2018	Diagnóstico HP más IHQ 2004-2018
EAI	22	14
PF	23	24
PE	9	16
PPN	1	1
PV	2	3
EASA	14	16
LED	20	17
LECE	1	1
LE	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>93</b>	<b>93</b>

**Tabla 4:** enfermedades autoinmunes agrupadas por categorías.

<b>GRUPO</b>	<b>HP</b>	<b>HP más IHQ</b>
CP	35	44
LUPUS	22	19
EASA	14	16
EAI	22	14
<b>TOTAL</b>	<b>93</b>	<b>93</b>

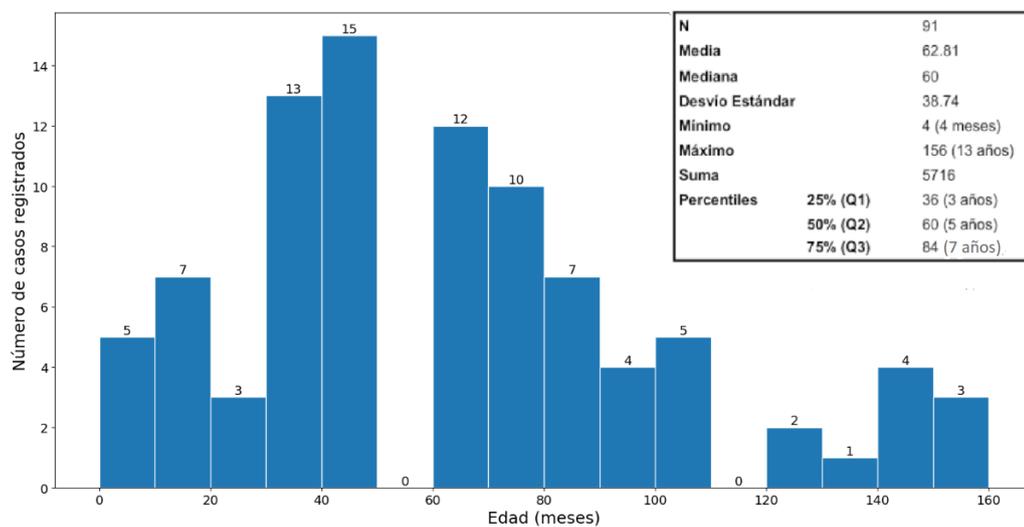
### *Análisis de los datos de la historia clínica*

Del análisis de las historias clínicas se evaluaron los datos de la reseña de los perros afectados con dermatosis autoinmunes. Se obtuvieron registros clínicos de 93 casos, 91 tenían registro de edad, y los valores se expresaron en meses. Con los datos obtenidos se realizó un histograma (Figura 8) que permite observar que los pacientes tenían entre 4 y 156 meses (13 años), con una media de 62.81 meses (5,2 años). El 50% de éstos se encontró entre 36 (3 años) y 84 meses (7 años).

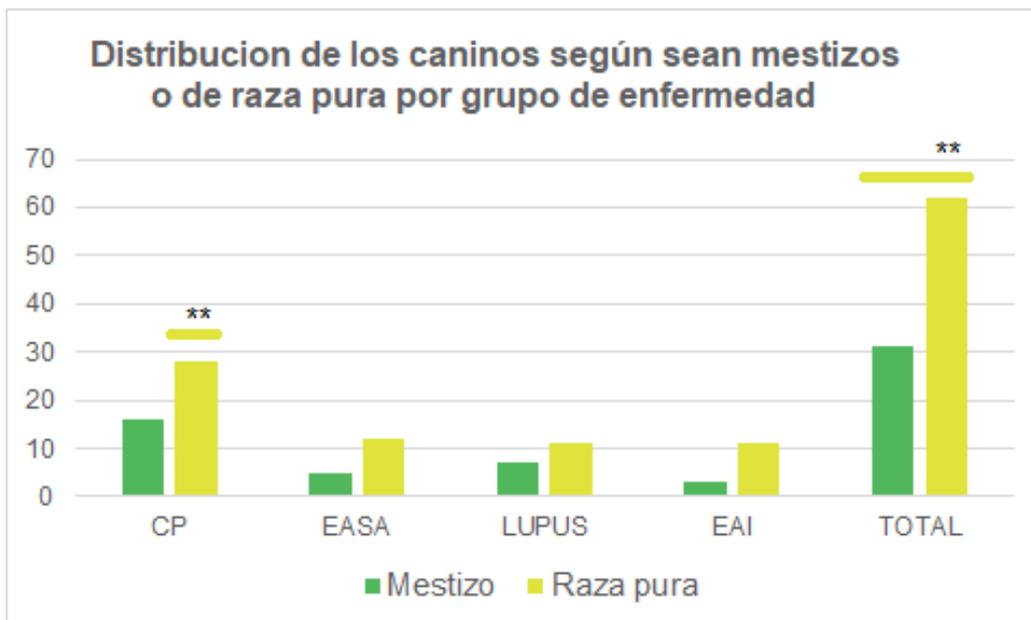
En el 33,33% de los casos (31/93) los pacientes eran mestizos y en el 66,67% (62/93) eran de raza pura. En este sentido, se observaron diferencias significativas entre la frecuencia de presentación de las enfermedades autoinmunes entre los mestizos y los animales de raza pura ( $p < 0.0001$ ) (Figura 9). Las razas más afectadas fueron el Collie (11/62), Pastor Alemán (10/62), Cocker Spaniel (6/62) y Labrador Retriever (5/62) (Tabla 5-Anexo VII). La distribución de los caninos según sean de raza o mestizos se clasificó por grupo de enfermedad. Del total de pacientes mestizos ( $n=31$ ), el 51,60% tenían algún tipo de pénfigo (16/31), al igual que en los caninos de raza Pastor Ovejero Alemán y Labrador Retriever, donde el 60% se vio afectado por algún tipo de pénfigo (6/10 y 3/5, respectivamente). En cambio, los caninos de raza Collie se vieron afectados de igual forma por las enfermedades del CP y Lupus (5/11-45,45%). No se observaron diferencias significativas entre la frecuencia de presentación de los diferentes tipos de enfermedad autoinmune en los animales mestizos. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas

en la frecuencia de presentación del CP en relación al Lupus y a las EASA en los animales de raza pura (Figura 10).

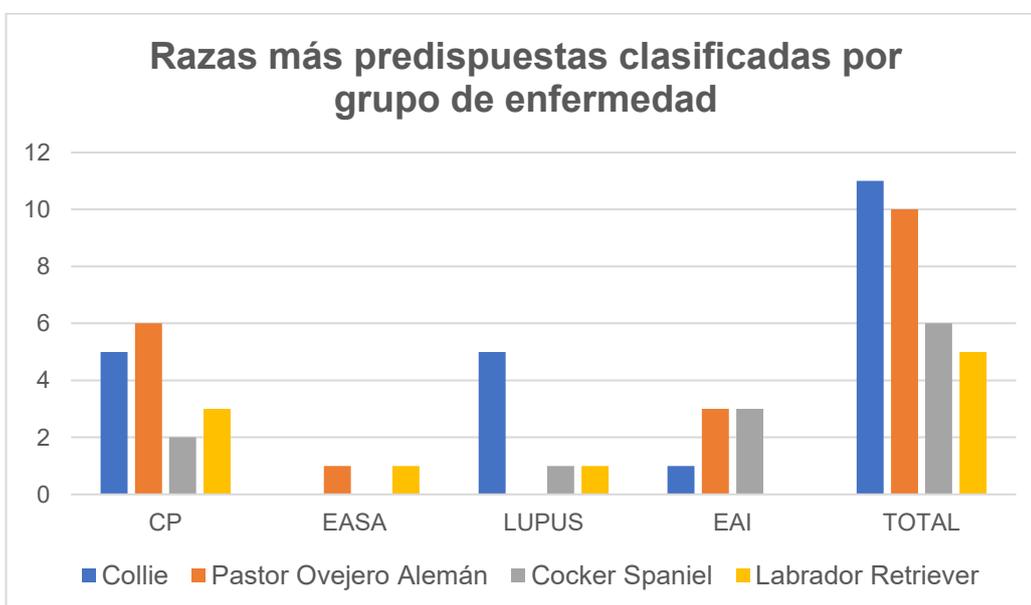
En 88/93 casos fue registrado el sexo, resultando la frecuencia de presentación entre machos (46/88) y hembras (42/88) similar y el resultado estadístico fue no significativo (estadístico: diferencia de proporciones  $p=0,5485$ ).



**Figura 8:** histograma que muestra la distribución de las edades de los pacientes con enfermedad autoinmune.



**Figura 9:** distribución de los caninos con enfermedad autoinmune: mestizos o de raza pura por grupo de enfermedad. Los (\*\*) indican diferencias significativas entre los datos analizados.



**Figura 10:** distribución de los caninos por razas más predisuestas y clasificados por grupo de enfermedad.

### *Lesiones macroscópicas*

Se registraron en planillas de cálculo los datos del aspecto macroscópico de la piel obtenidos de las historias clínicas proporcionadas por el veterinario clínico y de los registros del Laboratorio de Patología Especial al momento del ingreso de las muestras. Los datos obtenidos y analizados provienen del estudio retrospectivos (2004-2014) y del estudio prospectivo (2015-2018). Los datos fueron clasificados en base a los diagnósticos obtenidos mediante el estudio histopatológico y la IHQ. En este análisis se trabajó con los 79 casos en los que se pudo determinar el tipo de enfermedad autoinmune (CP, Lupus y EASA). Las lesiones se clasificaron según su tipo y ubicación anatómica en el animal. Entre los tipos de lesiones cutáneas primarias y secundarias observadas, las más frecuentes fueron costras (45,57%), úlceras (35,44%) y alopecia (30,38%) (Imágenes 1 y 2), mientras que las pústulas y las vesículas representaron el 7,60% y el 2,53% respectivamente (Imágenes 3 y 4) (Tabla 6-Anexo VII).

También fue analizada la ubicación anatómica de las lesiones en la piel, las cuales tuvieron una frecuencia de presentación variable con una tendencia a afectar la región dorsal de la nariz, denominada comúnmente plano nasal (41,77%), la zona periocular (35,44%) y la nariz u hocico (26,58%) (Imagen 5). Las lesiones ubicadas en las uniones mucocutáneas (labios, nariz y ano) y en áreas de mucosa (oral, conjuntival, nasal y genital) se observaron en el 39,24% y el 13,92% de los casos respectivamente (Tabla 7-Anexo VII).



**Imagen 1:** PF: lesiones costrosas y ulceradas en el dorso de un canino.



**Imagen 2:** PV: lesiones alopécicas generalizadas en un canino. Inicio del cuadro clínico.



**Imagen 3:** PF: lesión pustular en el vientre de un canino.

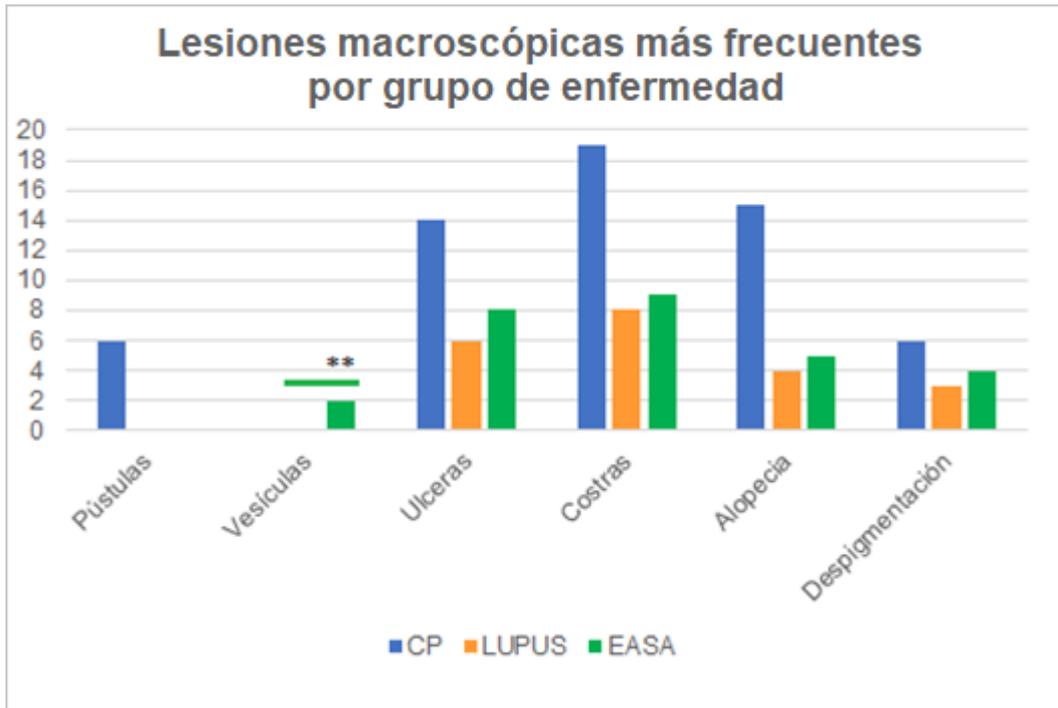


**Imagen 4:** EASA: lesión vesicular en el vientre de un canino.

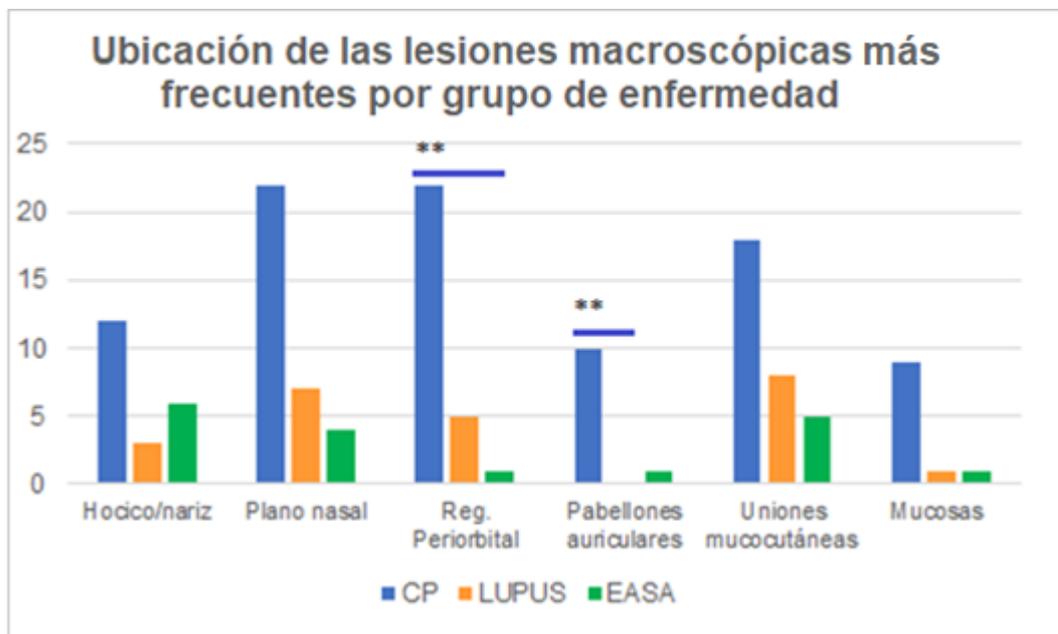


**Imagen 5:** PE: lesiones costrosas ubicadas en el puente nasal y región periorbital de un canino.

Del análisis individual de las lesiones en los diferentes grupos de enfermedades se observó que los caninos con CP presentaron más frecuentemente costras y alopecia, en cambio, los caninos con EASA y lupus presentaron costras y úlceras como lesiones más frecuentes. En el análisis estadístico (Test Z) se observó que la presencia de vesículas tiene diferencias significativas en los caninos con EASA en comparación con los caninos que presentan vesículas en el CP y lupus (Figura 11). Las zonas más afectadas en pacientes con CP fueron el plano nasal y la región periorbital. En los casos de lupus el plano nasal, las uniones mucocutáneas (particularmente la unión mucocutánea nasal) y el hocico o nariz propiamente dicha fueron las zonas más comprometidas. Por último, en las EASA, las zonas más afectadas fueron el plano nasal y el hocico o nariz. En el análisis estadístico (Test Z) se observaron diferencias significativas en la ubicación de las lesiones en la región periorbital de pacientes con CP en relación a los pacientes con EASA. Lo mismo ocurrió con la presencia de lesiones en los pabellones auriculares de pacientes con CP en relación a aquellos que presentaban lupus. (Figura 12).



**Figura 11:** lesiones macroscópicas más frecuentes clasificadas por grupo de enfermedad. Los (\*\*) indican diferencias significativas entre los datos analizados.



**Figura 12:** ubicación de las lesiones más frecuentes clasificadas por grupo de enfermedad. Los (\*\*) indican diferencias significativas entre los datos analizados.

### *Lesiones microscópicas*

Las lesiones microscópicas se clasificaron según su ubicación en la piel en: epidérmicas, unión D-E y dérmicas. El hallazgo más frecuente en la epidermis fueron las pústulas (81,01%) Las mismas tenían ubicación subcorneal, intragranular, suprabasal y folicular (Imagen 6). Los queratinocitos acantolíticos se observaron en 19 de los 44 casos de CP que presentaron pústulas estando siempre acompañados de neutrófilos (Imagen 7). La espongirosis (60,76%), acantosis (37,97%) (Imagen 8) e hiperqueratosis (55, 67%) ortoqueratótica (Imagen 9) y paraqueratótica también fueron hallazgos frecuentes.

A nivel de la unión D-E el hallazgo más constante fue la separación entre la epidermis y la dermis (44,30%) (Imagen: 10).

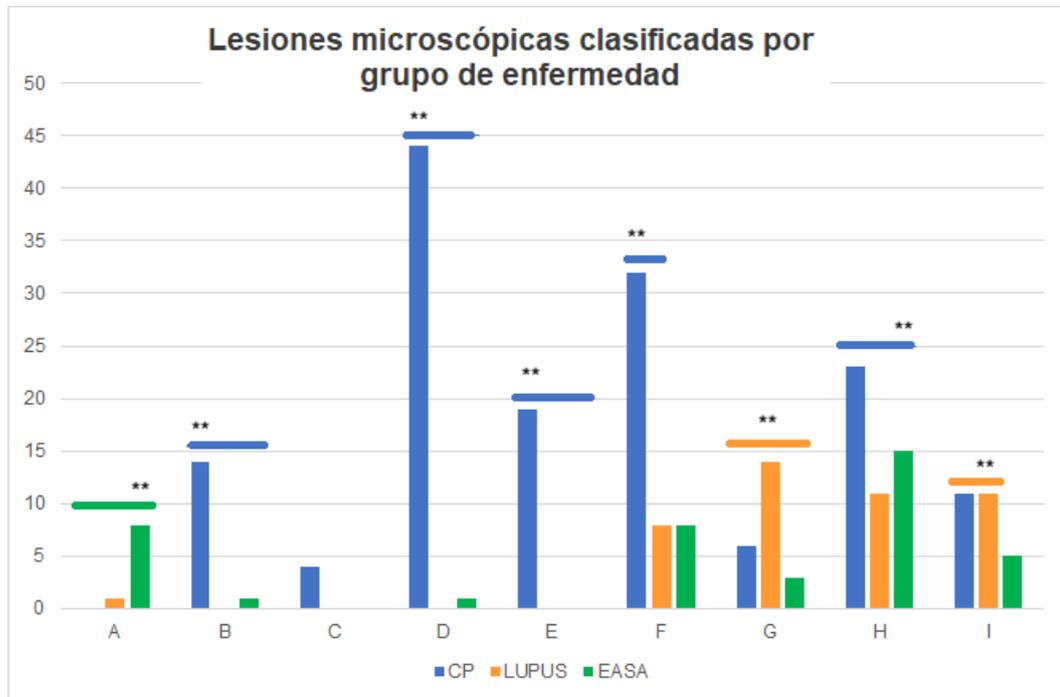
En la dermis el infiltrado inflamatorio predominante fue mononuclear (células plasmáticas, macrófagos y linfocitos) aunque, en ocasiones, se presentó un infiltrado inflamatorio de tipo mixto con presencia agregada de neutrófilos. Como se observó una gran variación en la cantidad de células que infiltraban la dermis se realizó una clasificación subjetiva en leve (+), moderado (++) , abundante (+++). Se identificó un tipo especial denominado liquenoide, que se caracterizó por una severa infiltración inflamatoria mixta que oscurece la unión D-E y que se observa en enfermedades como el LED y PE. Los infiltrados inflamatorios leve y moderado fueron los más frecuentes (29,11%). El infiltrado inflamatorio de tipo liquenoide (Imagen: 11), se observó en el 24,05% de los casos. La incontinencia pigmentaria

(Imagen: 9), otro hallazgo también frecuente, se encontró en el 34,17% de los casos.

En lo que respecta a las lesiones halladas por grupo de enfermedades, en el CP, las lesiones microscópicas más frecuentes se encontraron en la epidermis y fueron: pústulas y espongirosis. En los pacientes con lupus, los hallazgos más constantes fueron la degeneración de células basales, la apoptosis y la incontinencia pigmentaria. Por último, los hallazgos más frecuentes en las EASA fueron las vesículas y la separación D-E. (Tabla 8-Anexo VII).

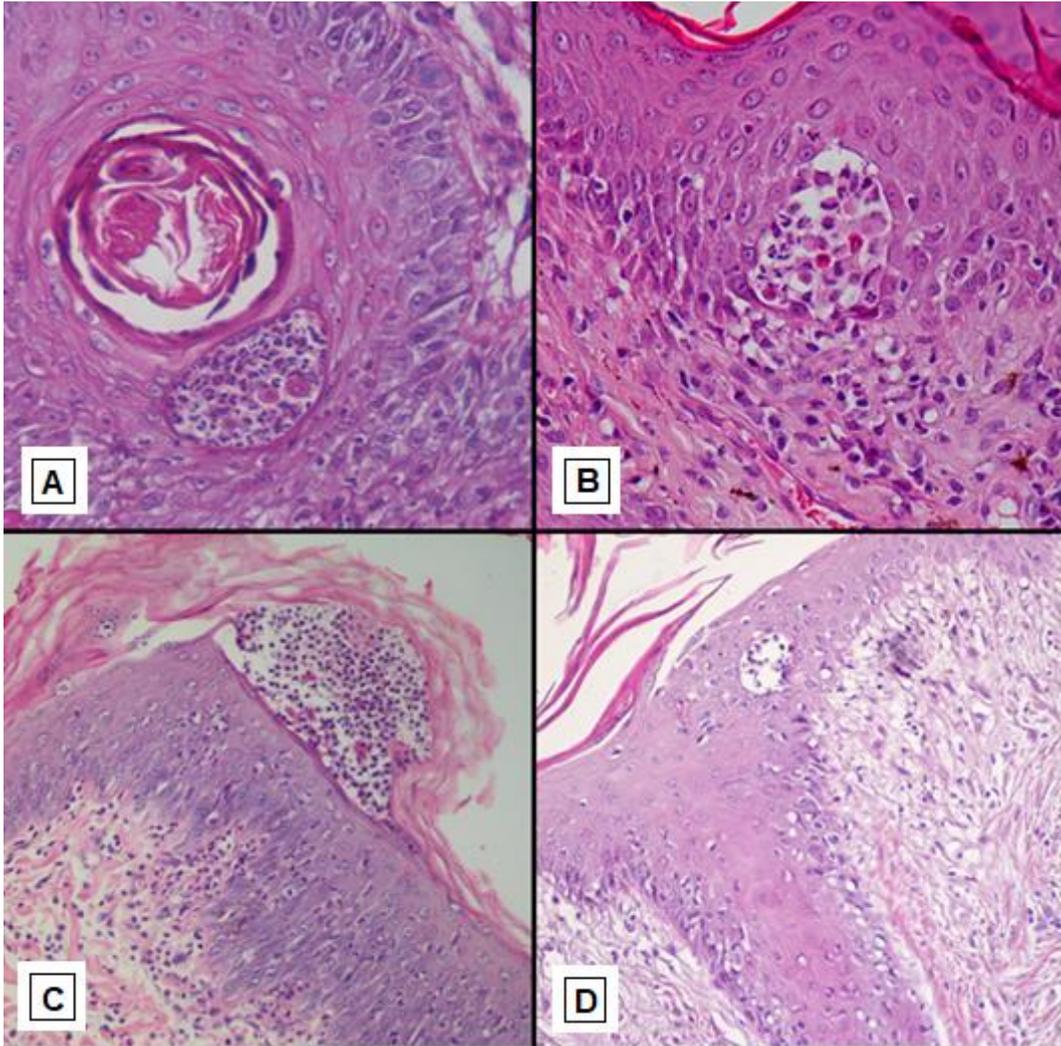
En el análisis estadístico (Test Z) de las lesiones microscópicas se observaron diferencias significativas en la presencia de vesículas en los pacientes con EASA en relación a aquellos que tenían CP y lupus. La presencia de pústulas foliculares, intragranulares y subcorneales fueron significativamente diferentes en pacientes con CP en comparación con aquellos que presentaba lupus y EASA. Lo mismo sucedió con la presencia de queratinocitos acantolíticos en el interior de las pústulas de pacientes con CP. La espongirosis fue identificada en el CP y también en los caninos que presentaron lupus, no así con aquellos que presentaron EASA. La degeneración vacuolar de células basales fue significativamente diferente en pacientes con lupus en relación con los que presentaron CP y EASA. La separación D-E y el desprendimiento de la epidermis fueron hallazgos significativos en los caninos con EASA en comparación con aquellos que presentaron CP y lupus. Por último, la incontinencia pigmentaria fue

significativa en pacientes con lupus en relación a los que tenían la misma lesión en el CP (Figura 13).

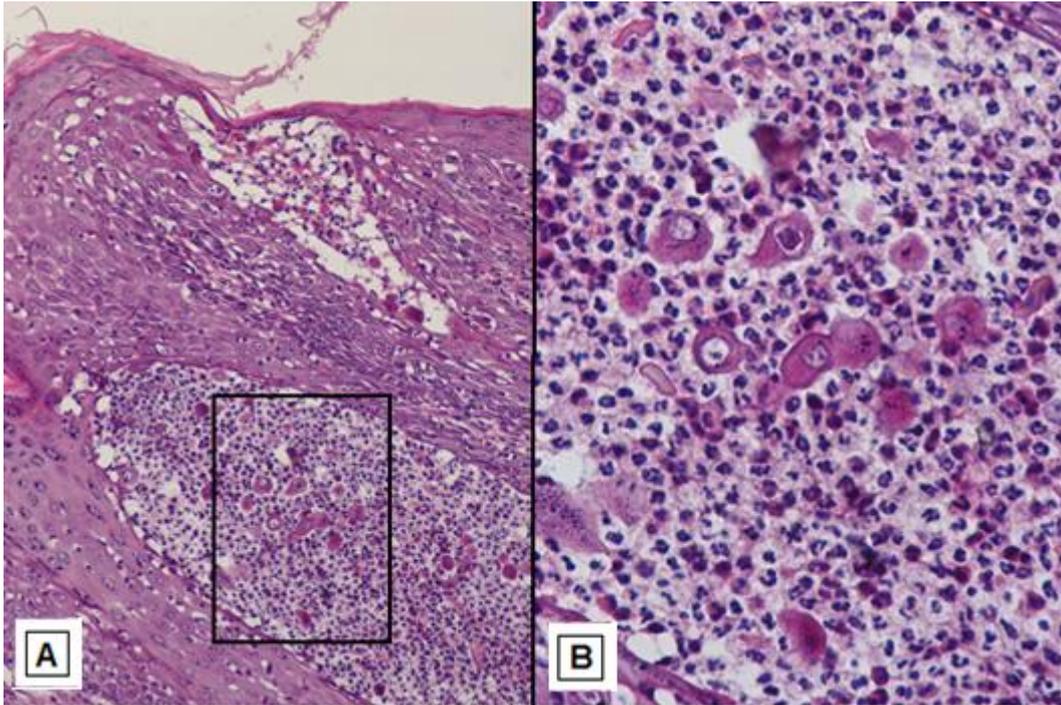


A: vesículas, B: pústulas foliculares, C: pústulas suprabasales, D: pústulas subcorneales e intragranulares, E: queratinocitos acantolíticos, F: espongirosis, G: degeneración de células basales, H: separación dermo-epidérmica, I: incontinencia pigmentaria.

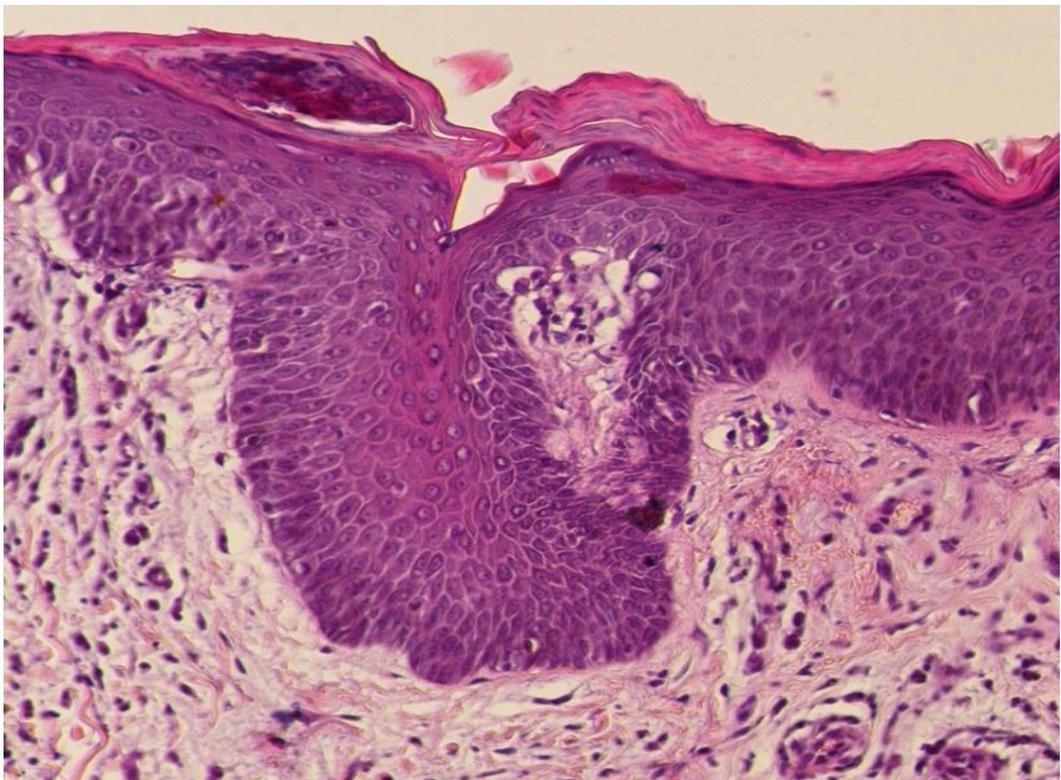
**Figura 13:** ubicación de las lesiones microscópicas más frecuentes clasificadas por grupo de enfermedad. Los (\*\*) indican diferencias significativas entre los datos analizados.



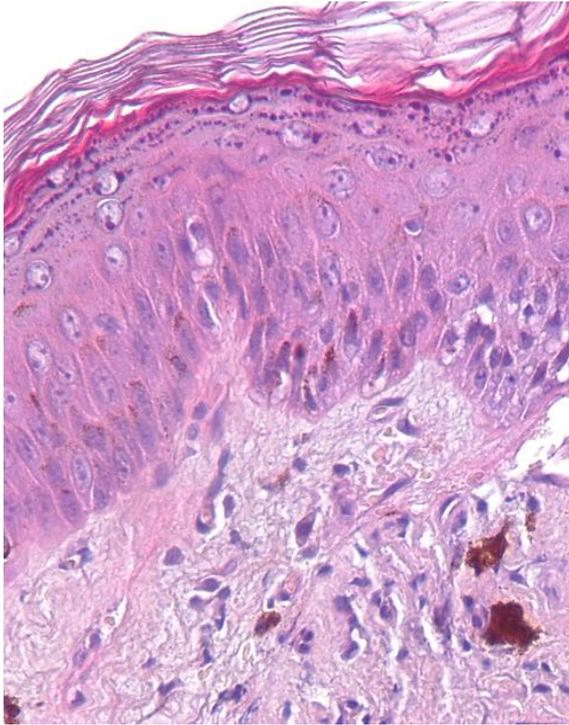
**Imagen 6:** **A:** PF: pústula folicular. H&E obj. 40x. **B:** PV: pústula suprabasal. H&E obj. 40x. **C y D:** PF: pústula subcorneal e intragranular respectivamente. H&E obj. 20x.



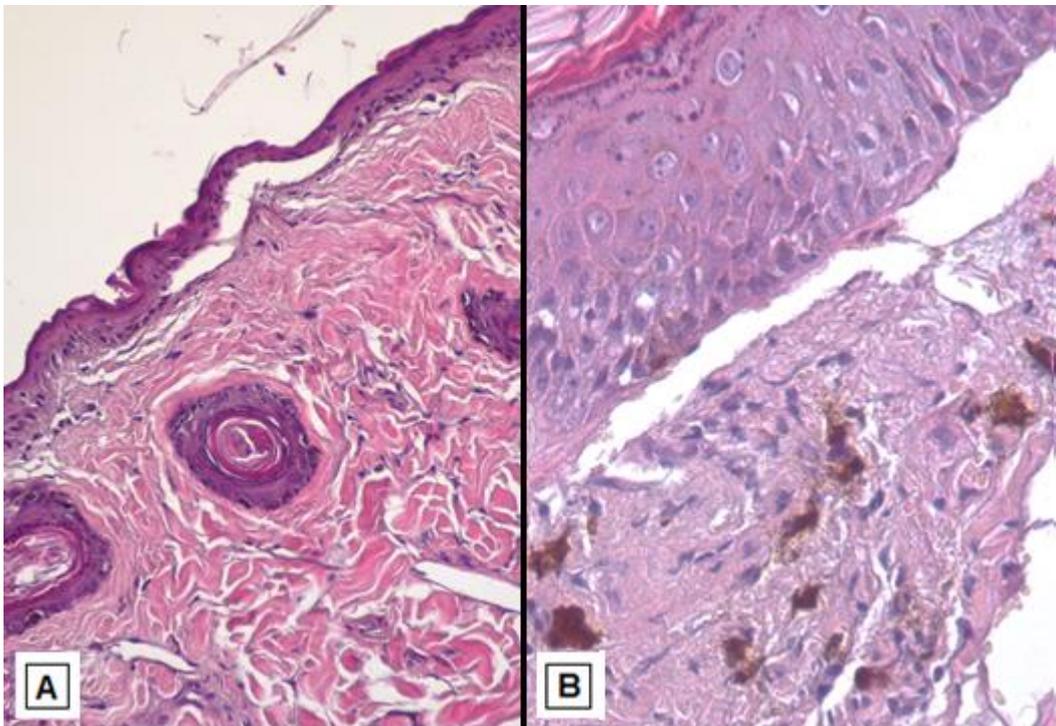
**Imagen 7: A:** PF: pústula intraepidérmica con presencia de queratinocitos acantolíticos y neutrófilos en su interior. H&E obj 20x. **B:** queratinocitos acantolíticos y neutrófilos. H&E obj 60x.



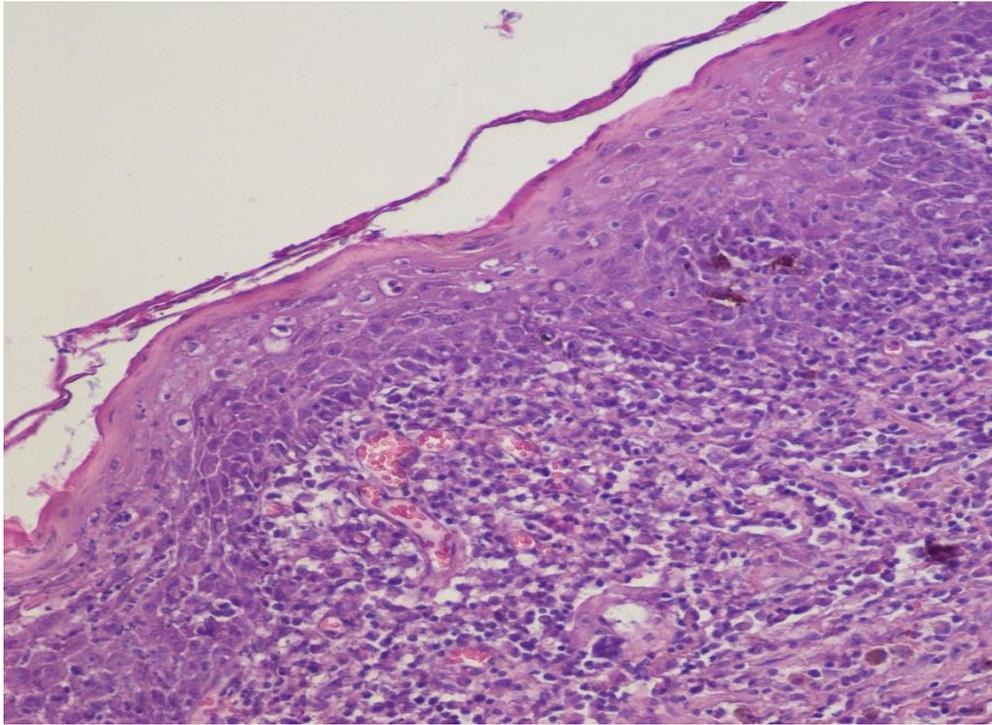
**Imagen 8: PE:** espongiosis y acantosis. H&E obj 20x.



**Imagen 9:** LED: hiperqueratosis ortoqueratótica e incontinência pigmentaria. H&E obj 40x.



**Imagen 10: A:** EASA: separación D-E. H&E obj 20x. **B:** LED: separación D-E e incontinencia pigmentaria en un canino. H&E obj.40x.



**Imagen 11:** LED: infiltrado inflamatorio tipo liquenoide con oscurecimiento de la unión D-E. H&E obj.20x.

### *Estudio inmunohistoquímico*

De los 93 pacientes evaluados durante el estudio retrospectivo y prospectivo al 79,57% (74/93) se les aplicó la técnica de inmunohistoquímica.

De las 74 muestras a las cuales se aplicó la técnica de IHQ se obtuvo un 77,03% (57/74) de resultados con inmunomarcación positiva y un 22,97% (17/74) de resultados que no presentaron inmunomarcación o bien esta resultó difusa o inespecífica. De las 57 muestras positivas a la técnica en un 21,05% (12/57) se arribó a un diagnóstico que permitió complementar o modificar el diagnóstico histopatológico (Tabla 9). En el restante 78,95%, la técnica IHQ permitió confirmar el diagnóstico histopatológico previo.

Los patrones de marcación hallados fueron los siguientes:

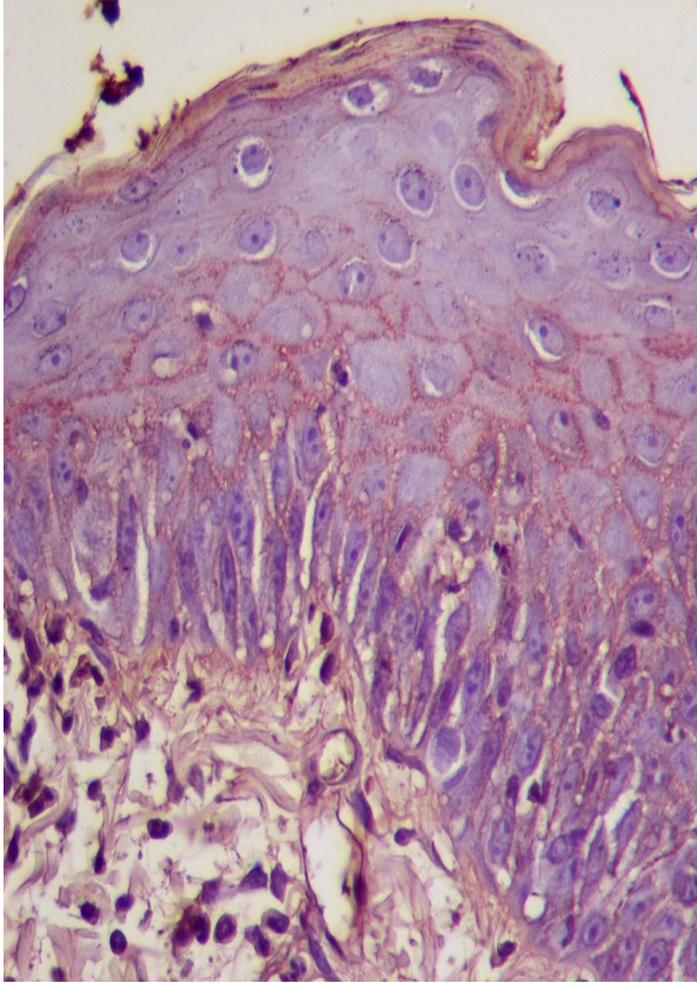
1. LED la inmunomarcación positiva se observó en la unión D-E y en la dermis dependiendo de la intensidad del infiltrado inflamatorio. En este sentido, en los casos en que se observó un leve infiltrado inflamatorio en dermis, la marcación se visualizó como una línea delgada por debajo de la unión D-E (Imagen 13). No fue así en los casos en donde el infiltrado inflamatorio era abundante o bien de tipo liquenoide, aquí la inmunomarcación se encontró entre las células inflamatorias (Imagen 14) y en el interior de las células plasmáticas (infiltrados linfopasmocitarios) (Imagen 15).
2. PF se observó inmunomarcación positiva alrededor de los queratinocitos de las capas superficiales (estratos corneo, lucido y

granuloso) (Imagen 12) así como también se observó depósito en el interior de algunos queratinocitos superficiales.

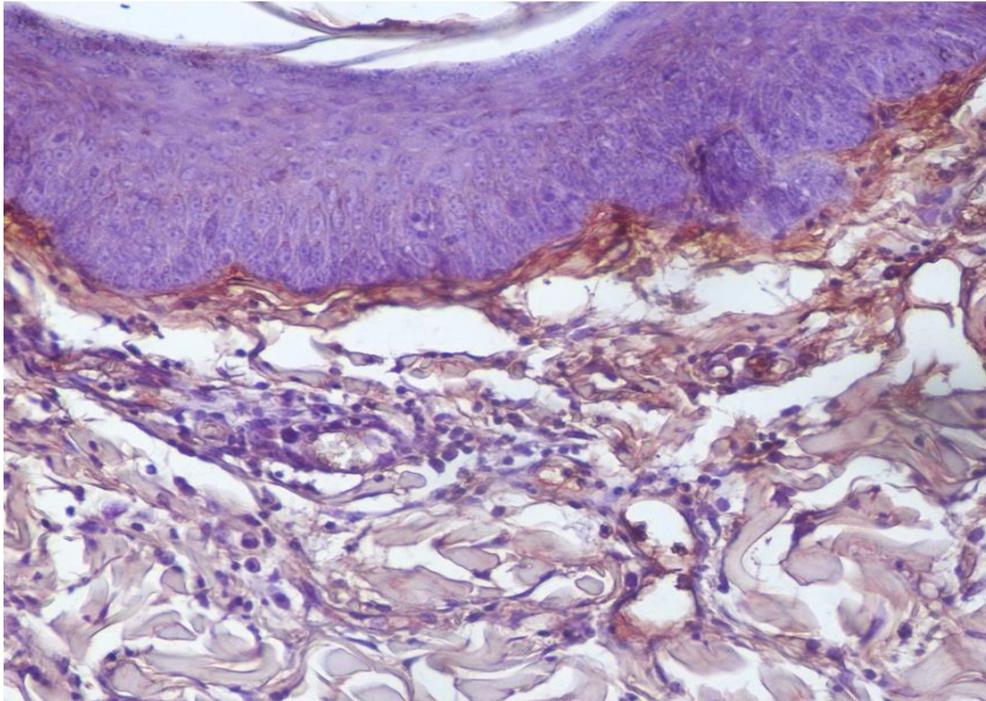
3. PE, la inmunomarcación positiva se ubicó tanto intercelularmente en las capas superficiales de la epidermis (Imagen 16) así como también por debajo de la unión D-E y al igual que en los casos de LED. Esta inmunomarcación varió desde una línea delgada (Imagen 17) a una zona de mayor tamaño cuando el infiltrado inflamatorio fue abundante. Los depósitos intercelulares presentes en el PF y PE se hallaron también, en algunos casos en el epitelio folicular.
4. PV, los depósitos se observaron en los espacios intercelulares de las capas basales de la epidermis. En las zonas con lesión, separación suprabasal, los depósitos se ubicaron por encima y por debajo de la separación.

**Tabla 9:** diagnósticos histopatológicos que fueron completados o modificados al aplicar la técnica IHQ.

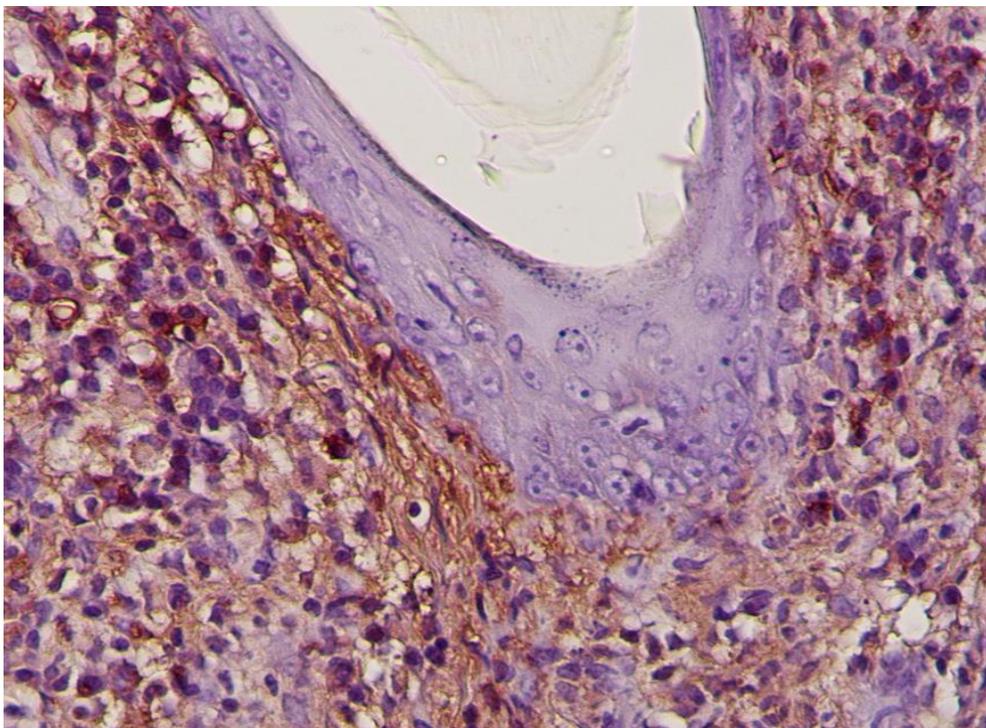
<b>Diagnóstico histopatológico</b>	<b>Diagnóstico inmunohistoquímico</b>
EAI	PE
EAI	PE
EAI	PE
LED	PE
EAI	PV
EAI	EASA
EAI	PE
EAI	PF
EAI	PF
PF	PE
LED	PE
LED	EASA



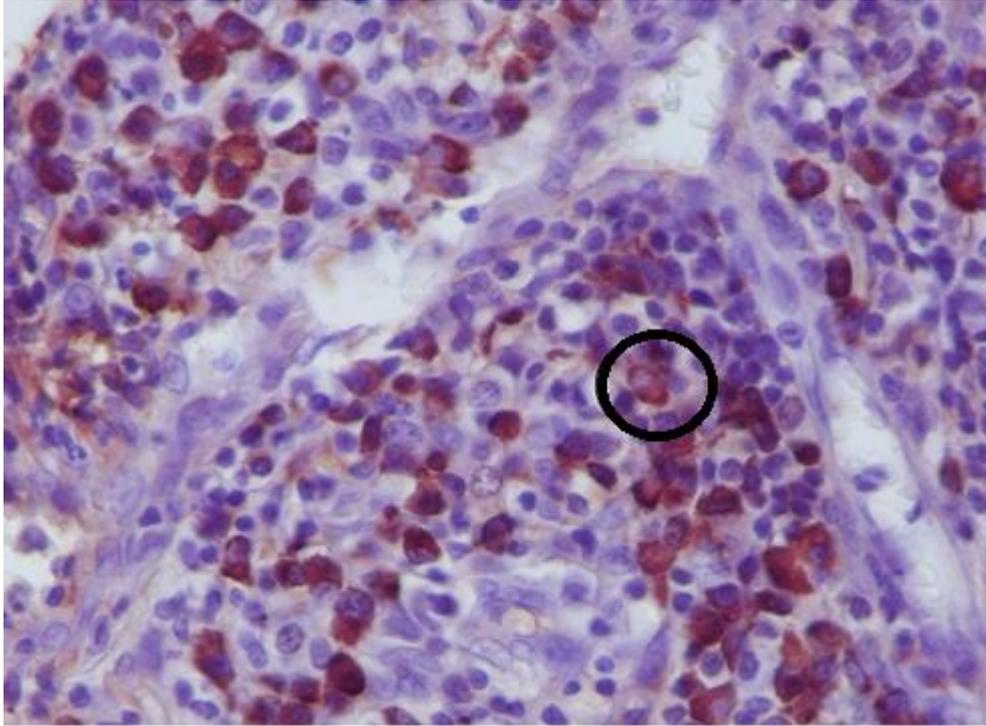
**Imagen 12:** PF: inmunomarcación positiva en los espacios intercelulares del estrato granuloso en PF. LSAB2, DAB y hematoxilina, obj. 40x.



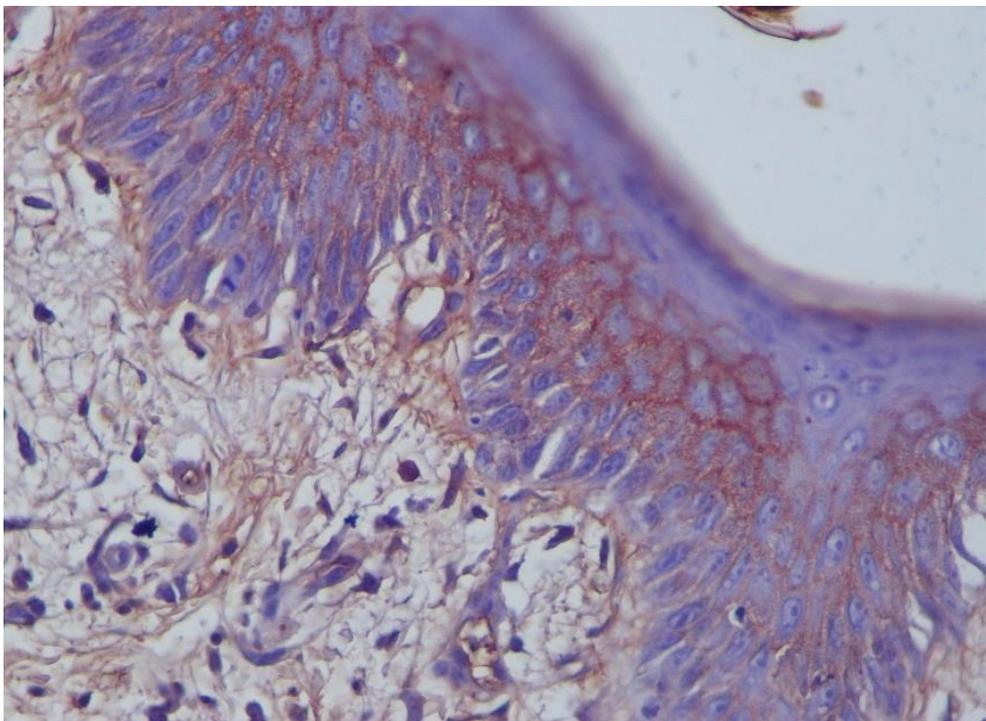
**Imagen 13:** LED: inmunomarcación positiva en la unión D-E, con un infiltrado leve. LSAB2, DAB y hematoxilina, obj. 20x.



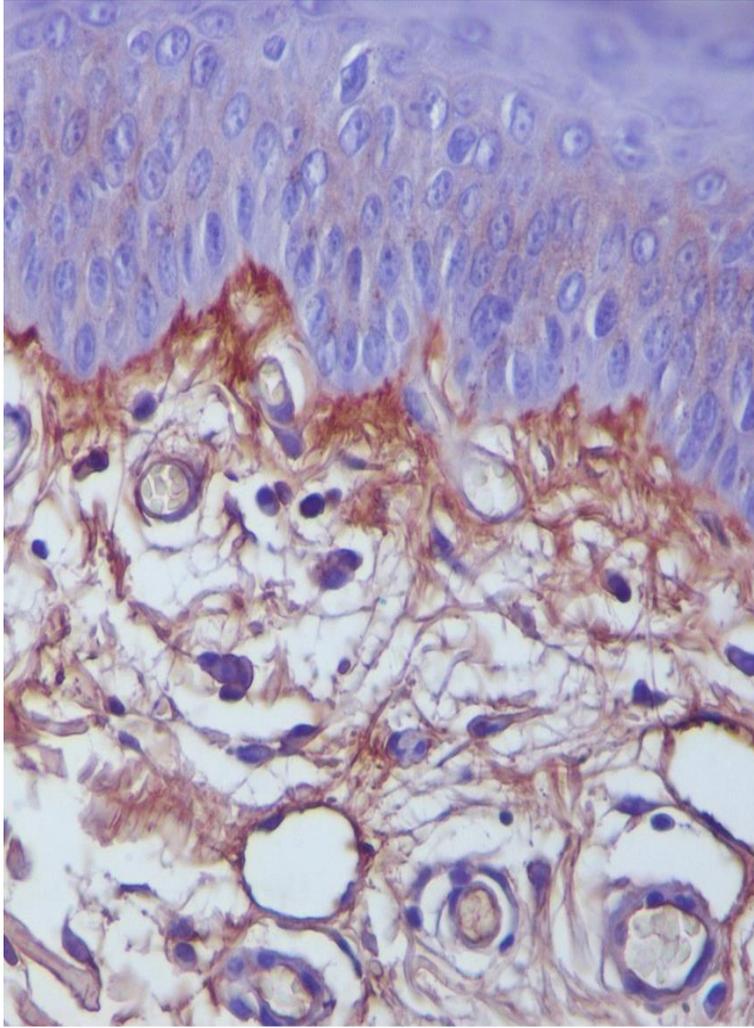
**Imagen 14:** LED: inmunomarcación positiva en la unión D-E y la dermis superficial, con un infiltrado tipo liquenoide. LSAB2, DAB y hematoxilina, obj. 40x.



**Imagen 15:** LED: el círculo muestra la Inmunomarcación positiva en el interior de las células plasmáticas presentes en la dermis. LSAB2, DAB y hematoxilina, obj. 60x.



**Imagen 16:** PE: inmunomarcación positiva en las capas superficiales de la epidermis y en dermis superficial. LSAB2, DAB y hematoxilina, obj. 40x.



**Imagen 17:** PE: inmunomarcación positiva en la unión D-E. LSAB2, DAB y hematoxilina, obj. 40x.

### *Estudio lectinohistoquímico*

La técnica de LHQ fue aplicada a 11 casos de piel: 3 PF, 3 LED, 3 PE, 2 PV y a un corte de piel normal y se trabajó con 7 lectinas (PNA, Con A, UEA 1, WGA, DBA, SBA, RCA). Los patrones hallados en cada una de las lectinas variaron entre enfermedades y la piel normal. En las tablas 10, 11, 12 y 13 ubicadas en el Anexo VII se observan los diferentes patrones hallados en los estratos de la epidermis (tanto en el citoplasma como intercelularmente), los folículos pilosos y la dermis, y, la intensidad de reacción en cada una de las zonas analizadas. La reacción se consideró negativa (-) cuando había ausencia de color, dudosa (+/-) cuando se observó una escasa cantidad de color y positiva cuando se observó marcación leve (+), moderada (++) e intensa (+++).

### *Comparación con la piel normal*

El primer análisis se realizó entre cada una de las enfermedades y la piel considerada normal. Para el caso del PF la lectina UEA 1 presentó marcación positiva con intensidad moderada (++) en los estratos espinoso/granuloso, lúcido y folículos pilosos, en todos los casos se observó color en el citoplasma e intercelular, siendo negativa para la piel normal (imagen 18). En el PV la lectina UEA 1 presentó positividad con intensidad de marcación moderada en el estrato lucido (citoplasma e intercelular) y los folículos pilosos no así en la piel normal donde solo presentó marcación a nivel folicular (imagen 19). La lectina UEA 1 fue negativa en el PE al igual que en la piel normal (imagen 20). Por último, en los casos de LED, la lectina UEA 1 fue positiva (++) en el estrato basal

(citoplasma), lucido (citoplasma e intercelular) y folículo piloso y negativa en la piel normal.

La lectina DBA resultó positiva (++) en el estrato lúcido (citoplasma) y folículos pilosos de la piel con PE y fue negativa en la piel normal.

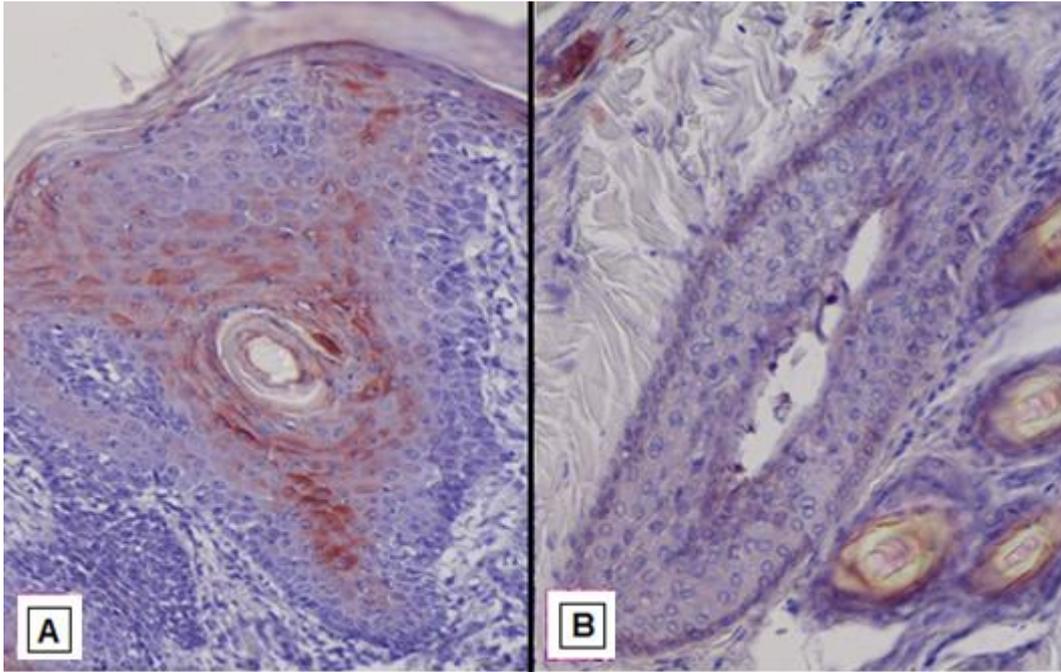
#### *Comparación entre las enfermedades*

El segundo análisis surge de observar los patrones de marcación entre enfermedades con el objetivo de poder encontrar diferencias entre ellas que puedan contribuir en el diagnóstico.

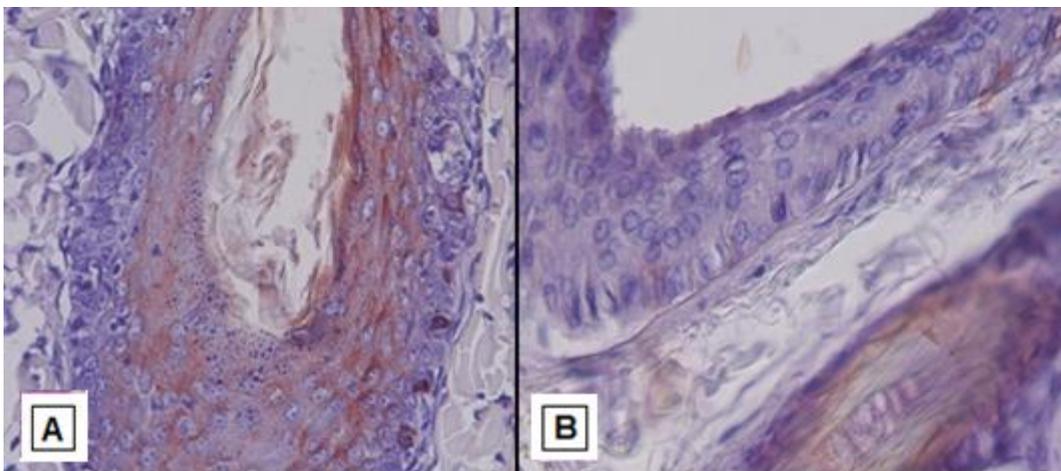
La lectina DBA mostro marcación moderada en el estrato lucido, granuloso y espinoso (citoplasma e intercelular) de PE y fue negativa en PF, PV y LED (imagen 21).

La lectina UEA 1 mostró marcación moderada en los estratos lucido y granuloso (citoplasma e intercelular) del PF y el LED, pero fue negativa en el PE.

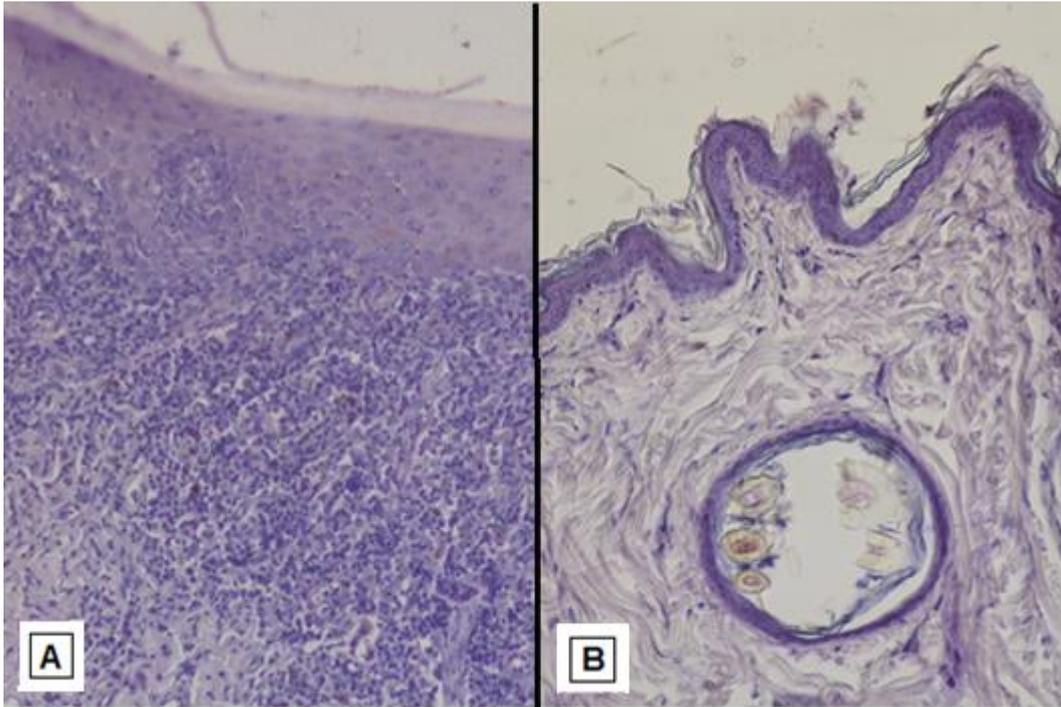
La lectina SBA mostro positividad en los estratos lucido, granuloso y espinoso de PE, LED, PF y PV, pero no en las últimas 4 a 6 capas de células de PE y LED y en las últimas 1 o 2 capas de células de la epidermis de PF y PV (imagen 22).



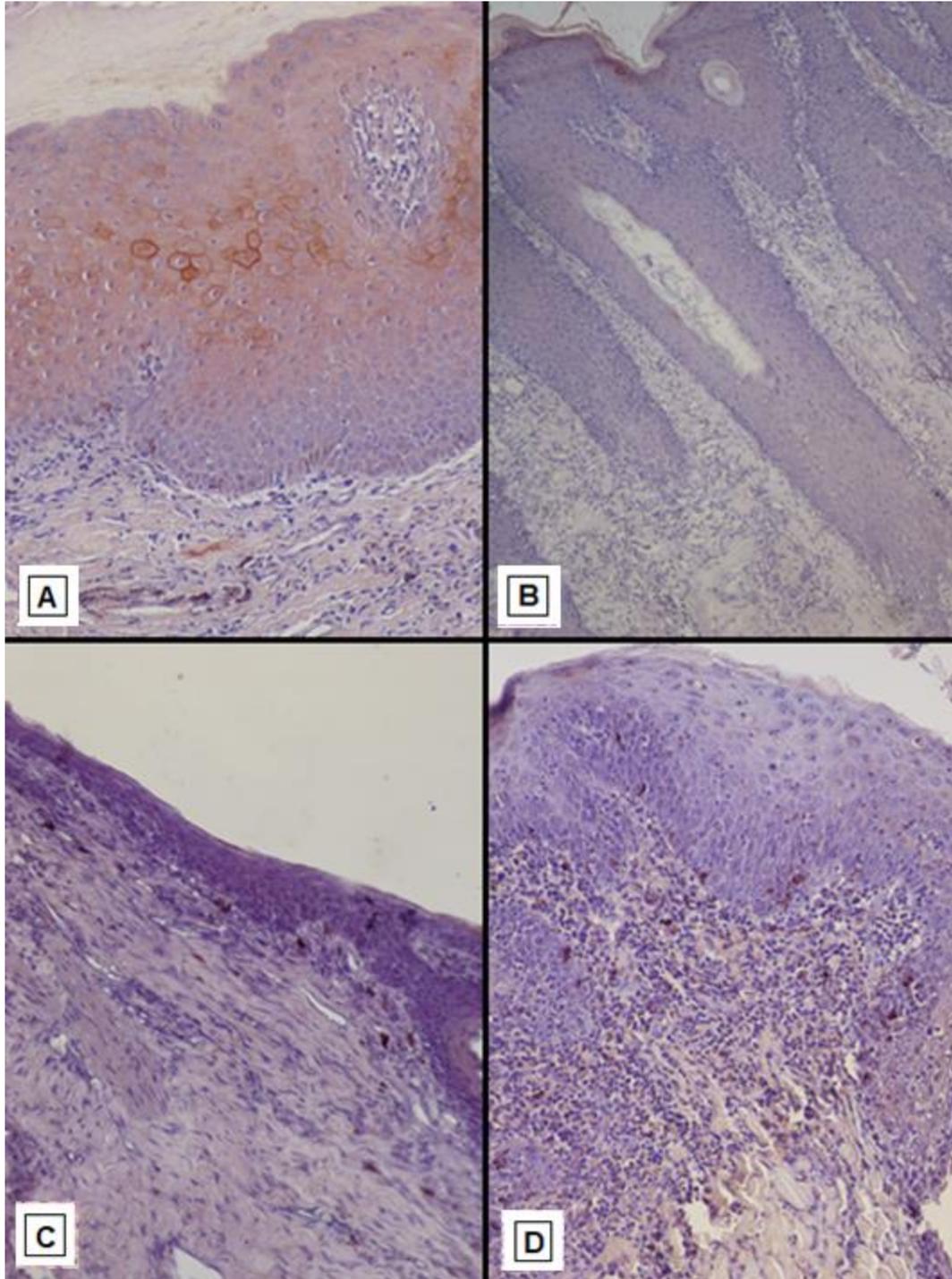
**Imagen 18: A:** PF: Lectina UEA 1 y su patrón de distribución en el epitelio folicular DAB-hematoxilina, obj. 20x. **B:** Piel normal: Lectina UEA 1 con ausencia de marcación en el epitelio folicular. DAB-hematoxilina, obj. 20x.



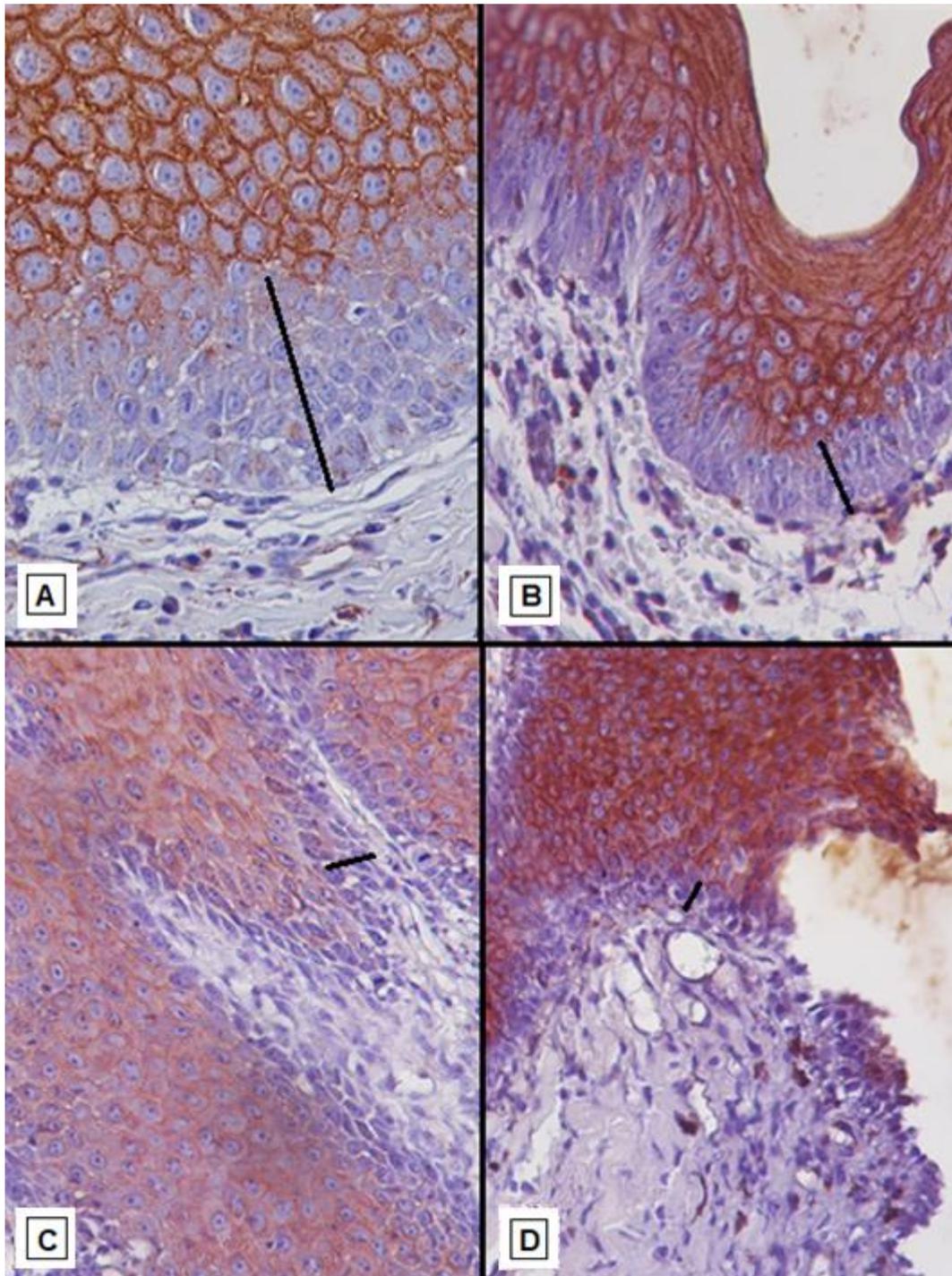
**Imagen 19: A:** PV: Lectina UEA 1 y su patrón de distribución que incluye toda la pared del folículo piloso. DAB-hematoxilina, obj. 20x **B:** Piel normal (derecha): lectina UEA 1 con ausencia de marcación, exceptuando la queratina del folículo piloso. DAB-hematoxilina, obj. 40x.



**Imagen 20: A:** PE: Lectina UEA 1 con ausencia de marcación. DAB-hematoxilina, obj.10x. **B:** Piel normal: Lectina UEA 1 con ausencia de marcación. DAB-hematoxilina, obj.10x.



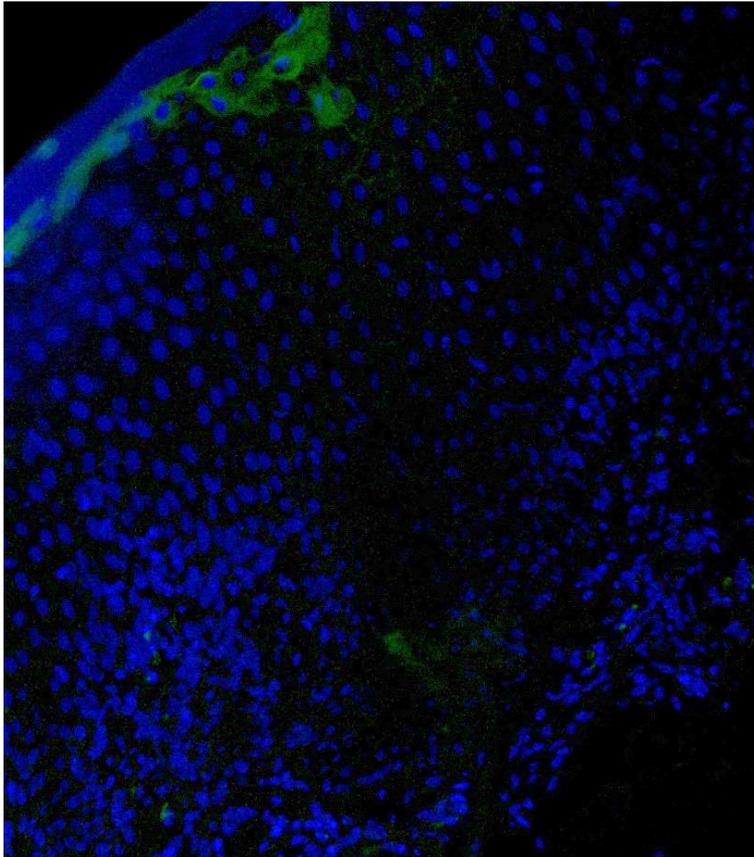
**Imagen 21:** **A:** PE: Lectina DBA con la presencia de marcación en estratos lucido, granuloso y espinoso en la piel de un canino. DAB-hematoxilina, obj. 20x. **B, C y D:** PF, PV y LED, respectivamente: Lectina DBA negativa. DAB-hematoxilina, obj. 10x y 20x.



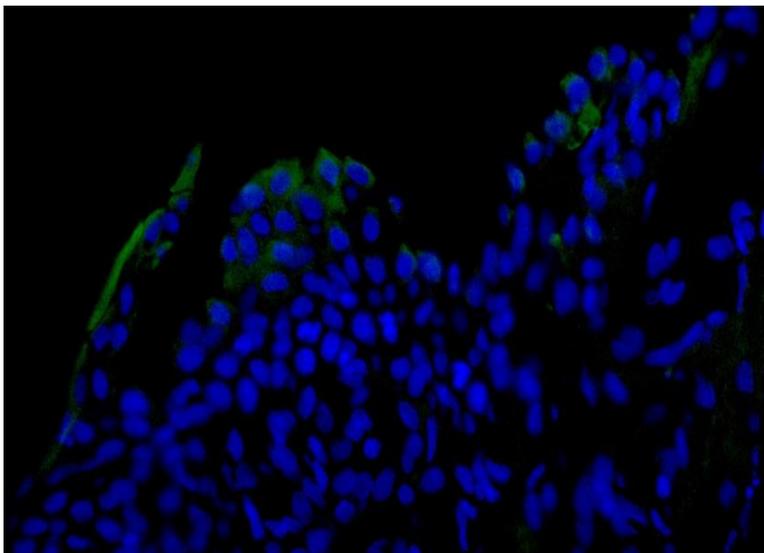
**Imagen 22: A y B:** PE y LED, respectivamente: Lectina SBA con ausencia de marcación en las últimas 4 a 6 capas de células de la epidermis, obj. 40 y 60x. **C y D:** PF y PV, respectivamente: ausencia de marcación en las últimas 1 a 2 capas de células de la epidermis. DAB-hematoxilina, obj. 40x.

### *Técnica de inmunofluorescencia*

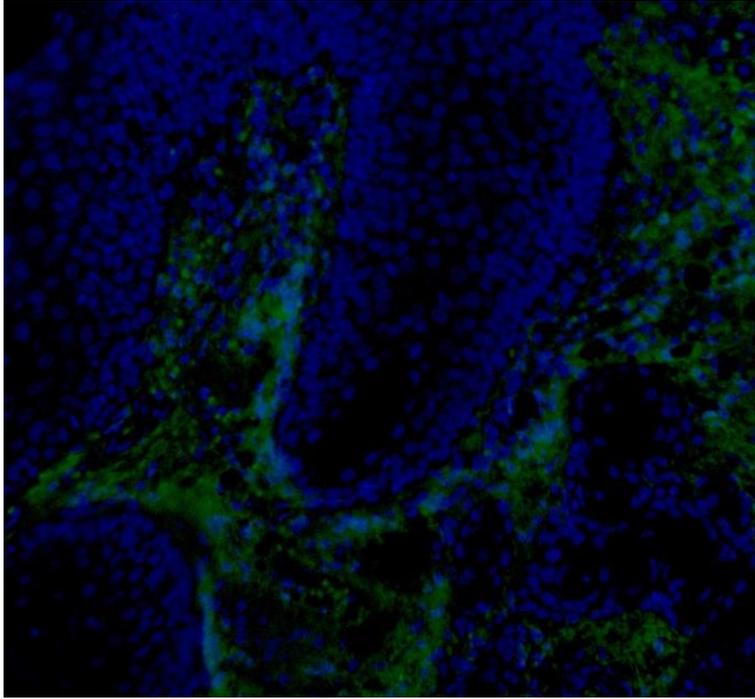
Los resultados observados al aplicar la técnica de IF-P directa fueron, en el caso de PE, inmunomarcación fluorescente inter e intracelular en el estrato lucido (imagen 23). En el PV inmunomarcación positiva en la denominada hilera de “células en lápida” en la epidermis suprabasal (imagen 24). En el LED se observó ausencia de marcación en la epidermis y positividad en la dermis, en los espacios intercelulares (imagen 25) y en las células plasmáticas producto de estar cargadas con IgG (imagen 26). En el PF presentó inmunomarcación en los estratos superficiales de la epidermis y folículos pilosos con ausencia de marcación en los estratos suprabasal, basal y dermis (imagen 27). Los núcleos celulares se evidenciaron de color azul por medio del DAPI en todos los cortes.



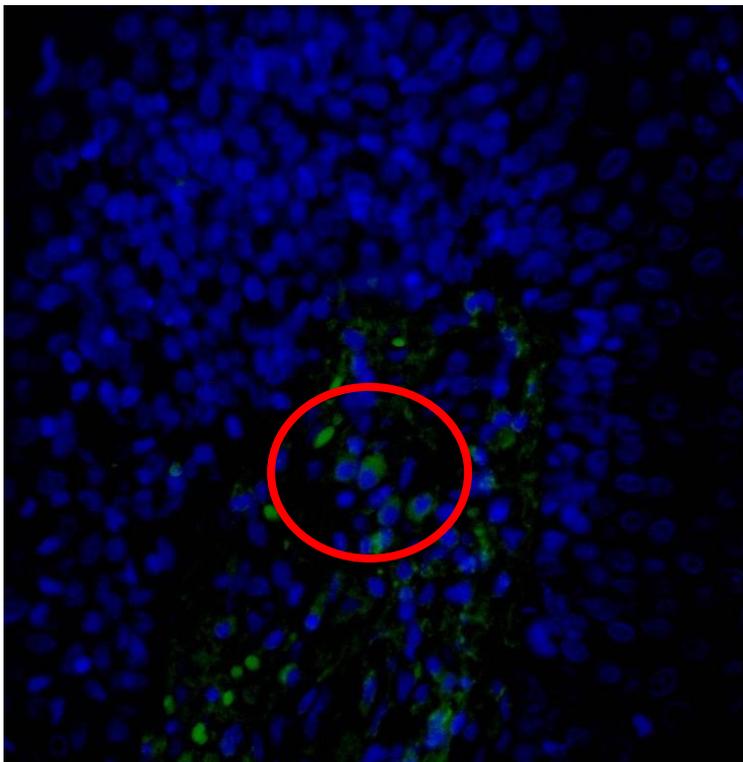
**Imagen 23:** PE: inmunomarcación con fluoresceína en un corte de piel, obj. 20x.



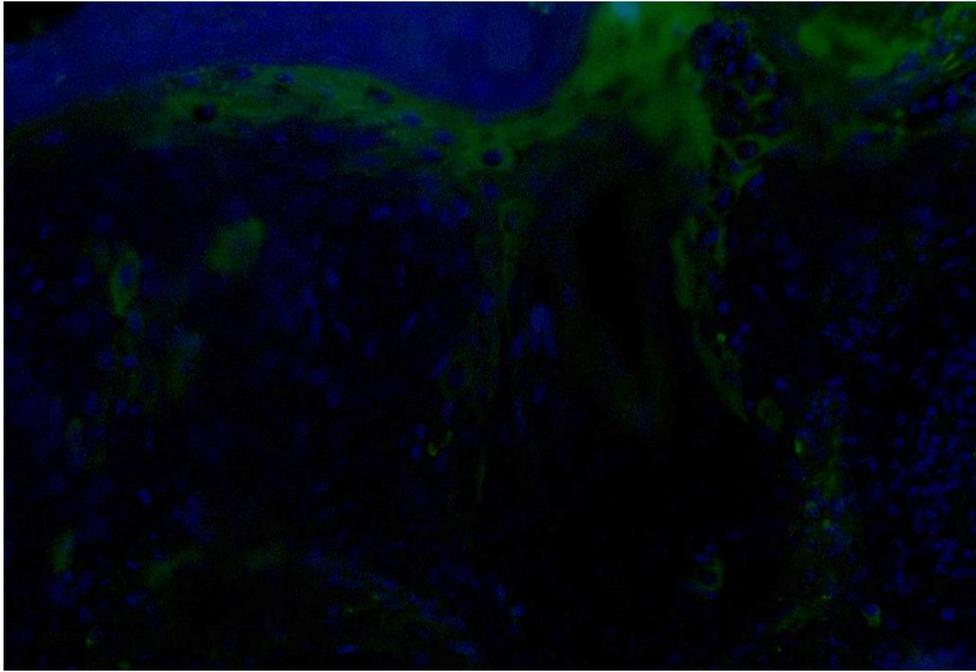
**Imagen 24:** PV: inmunomarcación con fluoresceína en un corte de piel, obj. 40x.



**Imagen 25:** LED: inmunomarcación con fluoresceína en un corte de piel, obj. 20x.



**Imagen x26:** LED: en el interior del círculo se observan células plasmáticas marcadas con fluoresceína en su citoplasma, obj. 40x.



**Imagen 27:** PF: inmunomarcación con fluoresceína en un corte de piel, obj. 20x.

## DISCUSIÓN

Las dermatosis autoinmunes en caninos son infrecuentes y de muy baja presentación clínica dentro del total de enfermedades que afectan a la piel (Mauldin y Peters-Kennedy, 2016). Según la bibliografía consultada se estima que las dermatosis autoinmunes representan solo el 1,4% de las dermatosis caninas (Larsson, 2005; Miller y col, 2014). En el presente trabajo las dermatosis autoinmunes representaron el 1,93% del total de casos, siendo este valor cercano a los descritos por los diferentes autores. Si analizamos la frecuencia de presentación de casos por año podemos observar que tenemos un promedio de 7,75 durante los 12 años que abarcó el estudio. Además, las enfermedades autoinmunes con la mayor frecuencia de diagnóstico histopatológico son el PF y el LED, representando el PF el 0,6% de las dermatosis caninas y el LED el 0,5% (Bedolla y col., 2009). Nuestros resultados se corresponden con la bibliografía ya que observamos un porcentaje similar para PF (0,48%) y LED (0,41%).

La aplicación de la técnica de IHQ en las dermatosis autoinmunes permite identificar la unión Ag-Ac en relación a los queratinocitos de las diferentes capas de la epidermis e infundíbulo folicular, como así también en la zona de interfase entre la epidermis y la dermis. En este sentido, esta técnica resultó muy útil para complementar el diagnóstico HP, y pudimos observar que el PE se hallaba sub-diagnosticado. El PE es una entidad que combina lesiones macroscópicas y microscópicas de PF y LED (Miller y col., 2014). Al aplicar la técnica de IHQ vimos que al total de casos de PE

diagnosticados por HP (n=9) se le sumaron 7 casos cuyo diagnóstico fue modificado y finalmente resultaron un total de 16 casos. Asimismo, lo opuesto ocurrió con las dermatosis inespecíficas, denominadas como EAI, cuyo número de diagnósticos histopatológicos sumo 22 casos, pero al complementar la HP con la IHQ el número de diagnósticos disminuyó a 14. Estos 8 casos se reclasificaron principalmente como PE (n=4), y los restantes como PF (n=2), PV (n=1) y EASA (n=1). Cabe resaltar la importancia de la aplicación de la técnica de IHQ como complemento diagnóstico de la HP, sobre todo en relación a los casos con mayor dificultad diagnóstica como es el PE y las EAI.

Del análisis de los datos de las historias clínicas surgió que, al igual que lo observado por otros autores, no hemos encontrado diferencias significativas entre la presentación de la enfermedad en machos y hembras (Olivry y Chan, 2001; Olivry, 2006).

En este trabajo pudimos observar, al igual que en la bibliografía, que hay diferencias significativas en la presentación de estas enfermedades entre caninos mestizos y aquellos de diferentes razas, siendo más frecuentes en las razas puras. Las razas como Akita, Chow Chow, Daschund, Cocker Spaniel, Pastor Ovejero Alemán y Labrador Retriever más frecuentemente desarrollar algún tipo de pénfigo (Miller y col., 2014). Nosotros hemos observado que razas como el Pastor Ovejero Alemán y el Labrador Retriever fueron más frecuentemente afectadas por las enfermedades del CP. Asimismo, hemos observado que en el Collie la frecuencia de presentación de las enfermedades del CP y el lupus fue similar, a diferencia

de lo repostado en la bibliografía donde describen una mayor frecuencia de presentación para el LED (Goo y col., 2009). En este trabajo hemos observado una mayor presentación del CP en caninos de raza pura, no así en el lupus y las EASA, siendo estas diferencias significativas (Test Z, diferencia de proporciones). En lo que respecta a las EASA, son un grupo de enfermedades poco conocidas, no hay muchos reportes, y es relativamente reciente su incorporación a los diagnósticos diferenciales en dermatopatología. Asimismo, aún resulta complejo realizar el diagnóstico definitivo ya que son muy similares, tanto en su presentación clínica como en la manifestación histopatológica. Es por ello que se hace necesario aplicar técnicas adicionales más complejas para arribar a su diagnóstico. Además, podemos sumar la escasez de datos en la bibliografía en relación a predilección etaria, por raza y sexo (Miller y col., 2014).

En relación a la edad, la bibliografía consultada establece usualmente un inicio de las lesiones desde mediana edad, aunque se han reportado casos en perros añosos, e incluso animales que inician alrededor del año de edad. El promedio de inicio de las lesiones es alrededor de los 5 años, dato que se corresponde con nuestro análisis estadístico (media: 5,2 años) (Gross y col., 2005; Mauldin y Peters-Kennedy, 2016).

Las pústulas y vesículas son un hallazgo característico de las enfermedades autoinmunes del CP y las EASA, no así en los diferentes tipos de lupus donde las lesiones macroscópicas más frecuentes son la despigmentación seguida de erosiones, úlceras y costras (Miller y col., 2014). Durante el examen clínico y el registro de las lesiones

macroscópicas se observó que las pústulas y las vesículas estaban en un porcentaje relativamente bajo, menor al 8% y 3%, respectivamente. En el caso, esto podría explicarse debido a que las mismas tienen un carácter transitorio producto de su fragilidad y rápida evolución a lesiones secundarias como úlceras y costras (Olivry y Linder, 2006; Olivry, 2009). En nuestro estudio pudimos observar que las costras, úlceras y alopecia fueron las lesiones macroscópicas más observadas. Cabe resaltar que, en la clínica diaria, estas son lesiones muy inespecíficas y se corresponden con más de una entidad cutánea. No obstante, el test estadístico utilizado permitió evidenciar que efectivamente las vesículas son lesiones propias de las EASA no así del lupus y CP.

Las zonas anatómicas más afectadas en caninos con PF son el plano nasal, la región periocular y los pabellones auriculares hallándose comprometidos en más del 80% de los casos. En el caso de los caninos con PE se suman a las lesiones anteriores, las ubicadas en la nariz. Los pacientes con PV presentan afectadas con más frecuencia las uniones mucocutáneas. En pacientes con lupus las lesiones comienzan en la nariz pudiendo extenderse a la región dorsal del plano nasal, pabellones auriculares y zona periocular. En los pacientes con EASA se ven afectadas tanto la piel con las uniones mucocutáneas de la cabeza y la cara, pero no de forma exclusiva ya que pueden presentarse lesiones en otras partes del cuerpo (Miller y col., 2014). Siguiendo con el lineamiento anterior, en nuestro análisis las zonas más afectadas fueron la región dorsal del plano nasal, la zona periocular y la nariz. El análisis estadístico arrojó que la zona

periorbital y los pabellones auriculares están más frecuentemente afectadas en pacientes con CP a diferencia de aquellos que tienen EASA y lupus respectivamente.

Los hallazgos microscópicos de acantosis, espongirosis y acantólisis con formación de pústulas que contienen queratinocitos acantolíticos en su interior permiten identificar a las enfermedades del CP. Estos hallazgos se deben a la falta de adhesión entre los queratinocitos. A diferencia de lo que sucede con las pústulas macroscópicas, las pústulas microscópicas se observaron en más del 80% de los casos, variando su ubicación en los diferentes estratos de la epidermis (subcorneal, intragranular, suprabasal y folicular) según el tipo de pénfigo. La identificación y la ubicación de las pústulas, y su asociación con la acantólisis son hallazgos de importancia relevante en el diagnóstico histopatológico de estas enfermedades. Las lesiones microscópicas más importantes del CP observadas en nuestro estudio se encontraron en la epidermis y fueron las pústulas, como se mencionó y la espongirosis. Cabe resaltar que la espongirosis es un hallazgo microscópico que pudo observarse en el CP y en los casos de lupus, no así en los casos de EASA.

En los casos de LED los hallazgos más frecuentes de carácter diagnóstico son la presencia de queratinocitos apoptóticos, infiltrado inflamatorio de tipo liquenoide, incontinencia pigmentaria, degeneración vacuolar de los estratos granuloso y basal, como así también áreas de separación dermo-epidérmica. Estos hallazgos están relacionados con la formación de auto-anticuerpos que, cuando se unen a antígenos, forman inmunocomplejos

que se depositan en la zona de membrana basal. En nuestro estudio pudimos observar, entre los hallazgos más frecuentes en los casos de lupus, la degeneración de células basales, la apoptosis y la incontinencia pigmentaria, siendo estos resultados coincidentes con los descriptos por los diferentes autores (Gross y col., 2005; Olivry y Linder, 2009). Cabe resaltar que la degeneración de las células basales fue un hallazgo significativamente diferente en el lupus en relación al CP y a las EASA.

Las EASA se caracterizan microscópicamente por la presencia de vesículas subepidérmicas generando extensas áreas de separación dermo-epidérmicas (Miller y col., 2014). Estos hallazgos se presentaron en nuestro trabajo tal cual lo cita la bibliografía, pudiendo encontrarse en las áreas de separación presencia de células inflamatorias. La formación de vesículas y la separación dermo-epidérmica fue el hallazgo significativamente diferente en los casos de EASA.

Los resultados se presentan en la tabla 14.

**Tabla 14:** patrones histopatológicos relevantes para el diagnóstico.

		CP		LUPUS	EASA
		PF, PV y PPN	PE		
<b>PATRONES HISTOPATOLOGICOS</b>	Pústulas				
	Vesículas				
	Queratinocitos acantolíticos				
	Acantosis				
	Espongiosis				
	Acantólisis				
	Degeneración vacuolar de cel. basales				
	Separación D-E				
	Infiltrado liquenoide				
	Apoptosis				
	Incontinencia pigmentaria				

En el análisis estadístico se realizó la comparación entre las enfermedades (CP, lupus y EASA), y se tuvo en cuenta los hallazgos más frecuentes en cada una. Se pudieron identificar entonces patrones de lesión para cada enfermedad que resultan de gran utilidad en el diagnóstico histopatológico. Los patrones observados fueron para el CP la presencia de pústulas y queratinocitos acantolíticos, lesiones que fueron significativamente diferentes con relación al lupus y EASA. La espongirosis se observó en el CP y en el lupus, no así en las EASA. La degeneración vacuolar de células basales fue un hallazgo significativo en los pacientes con lupus, no así en los pacientes con CP y EASA y la incontinencia pigmentaria fue significativamente diferente en el CP y el lupus en relación a EASA. Por último, la presencia de vesículas y la separación D-E fue significativamente diferente en pacientes con EASA en relación a los pacientes con lupus y CP.

La presencia de lesiones macroscópicas como pústulas, vesículas, así como erosiones, úlceras y costras debe alertar al clínico sobre la posibilidad de estar frente a una dermatosis autoinmune. La primera aproximación al diagnóstico se realiza por medio de la histopatología, la cual permite identificar los patrones de lesión presentes en las muestras y es en muchos casos el método por el cual se puede arribar a un diagnóstico definitivo. En las enfermedades que componen el CP las pústulas ubicadas en los diferentes estratos de la epidermis, junto a la presencia de acantólisis y queratinocitos acantolíticos, orientan hacia su diagnóstico específico. A diferencia de las enfermedades del CP, en las EASA es necesario contar

con la presencia de vesículas y separación a nivel de la unión D-E, encontrándose ausente la acantólisis y los queratinocitos acantolíticos. En los casos de lupus, el diagnóstico histopatológico se abre camino con la presencia de degeneración vacuolar de células basales, apoptosis, inflamación liquenoide en la unión D-E e incontinencia pigmentaria.

En la actualidad resulta indispensable la incorporación de técnicas inmunológicas que complementen el diagnóstico clínico e histopatológico con el fin de lograr una mejor clasificación y caracterización de este grupo de enfermedades, muchas veces, subdiagnosticadas. Es en este sentido que el uso de técnicas diagnósticas más complejas permite poner en evidencia cuales son los diferentes antígenos hacia los cuales se dirigen los autoanticuerpos propios de estas enfermedades.

La aplicación de la técnica IHQ fue un importante eslabón para complementar el diagnóstico histopatológico en aquellas enfermedades con un diagnóstico inconcluso como en el caso de las EAI donde se pasó de 22 casos con HP a 14 casos cuando se combinó la HP más IHQ. Asimismo, en otros casos permitió modificar el diagnóstico, como así también corroborar el diagnóstico ya realizado mediante la HP. Los patrones de inmunomarcación mediante el uso de una anti-IgG permiten diferenciar de forma clara y específica enfermedades como PF, PE, PV y lupus. Esto no sucede con las enfermedades que se denominan enfermedades ampollares subepidérmicas autoinmunes, EASA, ya que en todas ellas el patrón de inmunomarcación es el mismo, siendo un área o línea a nivel de la unión D-E, no pudiendo observarse diferencias entre este

grupo de enfermedades. Es necesario entonces para tal fin, la utilización de anticuerpos más específicos no disponibles en este momento en nuestro medio.

La aplicación del estudio lectinohistoquímico tuvo como objetivo principal aportar hallazgos que complementen el patrón de lesión y contribuyan de alguna manera al diagnóstico. En la epidermis normal se desarrolla el proceso de diferenciación de los queratinocitos, en este sentido las glicoproteínas juegan un papel importante en la regulación de su proliferación y diferenciación. La expresión de cambios en los glicoconjugados de la superficie de los queratinocitos podría relacionarse con la diferencia en la expresión de receptores en la superficie de las células epidérmicas, entonces las lectinas podrían usarse para identificar diferentes subpoblaciones de queratinocitos dentro de la epidermis (Desantis y col., 2003). En nuestro estudio pudimos observar que las lectinas UEA 1 y DBA mostraron diferentes patrones de marcación entre la piel normal y las enfermedades estudiadas (PF, PE, PV y LED). La lectina UEA 1 resultó negativa en todos los estratos de la piel normal, este hallazgo fue similar a lo observado por varios autores (Castagnaro y col., 1991; Desantis y col., 2003; Miyazawa y col., 1994; Suter y col., 1991), mientras que, si resultó positiva en todos los estratos epidérmicos de la piel con lesiones de PF, PV y LED. Una diferencia observada entre las enfermedades fue en el caso de PE, que la UEA 1 resultó negativa. Asimismo, la lectina DBA solo fue positiva en los casos de PE y negativa en la piel normal. Este último hallazgo fue ligeramente diferente a lo

observado por Desantis (2003) y Suter (1991), que identificaron marcación del estrato granuloso de la piel normal. Las diferencias observadas en la marcación lectinhistoquímica entre la piel normal y con lesión indicaría cambios en la expresión de las glicoproteínas. Estos resultados podrían ser de utilidad para complementar el diagnóstico histopatológico, principalmente en fases iniciales de la enfermedad o bien cuando el patrón histopatológico es más inespecífico. Se considera necesario aumentar el número de muestras con el fin de determinar un patrón de marcación lectinhistoquímico que permita establecer diferencias significativas entre la piel normal y con dermatosis autoinmune como así también entre las diferentes enfermedades.

En el presente realizó la técnica de IFD en parafina y sólo se pudo aplicar en un número muy pequeño de casos. Si bien los costos de la IF son menores, muchas veces la elección de aplicar la técnica de IF o la de IHQ dependerá de las posibilidades de cada laboratorio, más allá de las ventajas y desventajas de cada una de ellas, por ejemplo, la necesidad de contar con un microscopio de fluorescencia. En nuestro caso se optó por utilizar la técnica de inmunofluorescencia en parafina porque la logística de obtención de los cortes frescos y criopreservados resultó más dificultosa. Asimismo, pudimos observar que los cortes de tejidos preservados en parafina conservan muy bien su morfología y esto nos permitió relacionar la inmunomarcación con las diferentes estructuras histológicas. Así mismo, otra ventaja que observamos en relación a la IF convencional, en donde los tejidos utilizados deben estar criopreservados, es que en los tacos de

parafina la orientación de las piezas resultó mucho más fácil. Por último, los tejidos criopreservados no son de fácil acceso para todos los laboratorios a diferencia de los que sucede con los tejidos conservados en parafina tal como se plantea en la bibliografía (Parra-Medina y Polo, 2017).

## **CONCLUSIÓN**

Las dermatosis autoinmunes son de muy baja presentación dentro del total de enfermedades que afectan a la piel de los caninos. No obstante, estas enfermedades deben ser tenidas en cuenta e incluidas entre los diagnósticos diferenciales de aquellos pacientes que se presentan a consulta clínica/dermatológica con lesiones cutáneas como pústulas, vesículas, bullas y, más frecuentemente, costras, erosiones y úlceras en zonas como el dorso de la nariz, la zona periocular, los pabellones auriculares y la nariz propiamente dicha. Las lesiones son más comúnmente observadas en la piel y en las mucosas de la cara y secundariamente en el resto del cuerpo. Asimismo, es importante resaltar la existencia de una mayor predisposición en animales de raza pura, siendo el Collie, el Pastor Ovejero Alemán, el Cocker Spaniel y el Labrador Retriever las razas más predispuestas. La histopatología es un método muy útil para el diagnóstico de estas enfermedades y, en nuestro medio, sigue siendo la herramienta más utilizada por los clínicos y dermatólogos para arribar a un diagnóstico definitivo en este tipo de enfermedades. La identificación de patrones de lesión histopatológica en cada enfermedad permite arribar en numerosos casos a diagnósticos definitivos. No obstante, nuevas estrategias diagnósticas pueden ser aplicadas como métodos complementarios, como lo son técnicas de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia directa e indirecta que permiten evidenciar los diferentes autoanticuerpos y antígenos presentes en cada enfermedad y su ubicación sobre la piel. Estas técnicas son en muchos casos necesarias

para diferenciar las enfermedades autoinmunes, permitiendo arribar al diagnóstico definitivo.

## PROYECCIONES

Las proyecciones futuras se centran en:

- Poder desarrollar el uso de las lectinas y ampliar el estudio con el fin de complementar el patrón de marcación. Asimismo, ampliar el uso de esta técnica no solo en las enfermedades autoinmunes sino en enfermedades cutáneas de diferente origen.
- Poder aplicar la IFD a un mayor número de casos de enfermedades autoinmunes con el fin de valorar su utilidad como método complementario. Asimismo, poder aplicar en forma rutinaria la IHQ en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. Se tiene previsto la incorporación de las técnicas de IFD e IHQ como herramientas complementarias al diagnóstico histopatológico de las enfermedades autoinmunes en el Laboratorio de Patología Especial Veterinaria.
- Poder conocer y estudiar más a las enfermedades ampollares subepidérmicas autoinmunes. Durante el transcurso del desarrollo de esta tesis, muchos conceptos, conocidos y no tan conocidos acerca de estas enfermedades fue avanzando debido a los aportes en el campo de la medicina veterinaria, en particular en la dermatología, gracias al trabajo de importantes referentes mundiales en el tema.

## ANEXO I

### *Técnica Inmunohistoquímica*

Método de streptavidina-biotina-peroxidasa (LSAB 2HRP® (DakoCytomation, California, USA).

#### Procedimiento de marcación

1. Desparafinar: 2 pasajes en xilol durante 15 minutos cada uno a temperatura ambiente
2. Deshidratar: pasajes en alcohol durante 3 minutos cada uno:  
100° (2)  
96° (2)  
80° (1)  
70° (1)
3. Lavar con agua destilada durante 3 minutos
4. Lavar con PBS durante 5 minutos
5. Bloqueo de la peroxidasa endógena: solución de agua oxigenada al 3% en PBS durante 30 minutos
6. Lavar en PBS tween 20 (0,05µl tween en 100ml de PBS) pH 7,6 durante 10 minutos.
7. Recuperación antigénica: proteinasa K (Sigma Chem. Co®, St. Louis, MO, USA): dilución 1/50 en cámara húmeda a 37° C durante 10 minutos.
8. Lavar con agua destilada durante 10 minutos
9. Lavar con PBS tween durante 5 minutos

10. Bloqueo de las uniones inespecíficas: albúmina bovina sérica al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.
  11. Anticuerpo primario: Anti-IgG canina producida en conejo (AffinePure Rabbit Anti-Dog IgG, FC Fragment Specific. Lab. Jackson immunoresearch cod: 304-005-008). Dilución: 1/250 en cámara húmeda a 37° C durante 1 hora.
  12. Lavar 2 veces con PBS tween durante 5 minutos cada uno
- Técnica LSAB:
13. Anticuerpo secundario: Ac biotinilado anti-ratón anti-conejo (LSAB). en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos.
  14. Lavar 2 veces con PBS tween durante 10 minutos cada uno
  15. Complejo streptavidina-biotina-peroxidasa en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos.
  16. Lavar con PBS tween durante 10 minutos
  17. Revelar con una solución de DAB (diaminobencidina) (DakoCytomation, California, USA).
  18. Cortar la reacción con agua corriente
  19. Lavar con PBS tween 10 minutos
  20. Lavar con agua destilada
  21. Realizar una coloración de contraste con hematoxilina.
  22. Lavar con agua destilada durante 5 minutos.
  23. Hidratar con alcohol: 70° (1), 80° (1), 96° (2), 100° (2)
  24. Montaje

## ANEXO II

### *Técnica de Lectinohistoquímica*

Método de streptavidina-biotina-peroxidasa: LSAB 2 HRP (LSAB 2HRP®  
(DakoCytomation, California, USA).

Procedimiento de marcación:

1. Desparafinar: 2 pasajes por xilol durante 15 minutos a temperatura ambiente
2. Deshidratar: pasajes en alcohol durante 3 minutos cada uno:  
100° (2)  
96° (2)  
80° (1)  
70° (1)
3. Lavar con agua destilada durante 5 minutos
4. Lavar en PBS tween 20 (0,05µl tween en 100ml de PBS) pH 7,6 durante 10 minutos.
5. Realizar el bloqueo de las uniones inespecíficas: solución de albúmina bovina sérica al 1% en PBS durante 40 minutos a temperatura ambiente.
6. Incubación con las lectinas biotiniladas: (Vectastain Elite, Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, USA) según concentración de uso durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda.
7. Lavar con PBS tween 20 durante 10 minutos (en este paso se lava cada lectina por separado)

8. Técnica LSAB: incubar durante 30 minutos con el complejo Streptavidina-biotina-peroxidasa.
9. Lavar con PBS tween 20 durante 10 minutos.
10. Revelar con una solución de DAB (diaminobencidina) (DakoCytomation, California, USA).
11. Cortar la reacción con agua corriente
12. Lavar con PBS tween 20 durante 10 minutos
13. Lavar con agua destilada
14. Realizar coloración de contraste con hematoxilina
15. Lavar con agua destilada durante 5 minutos
16. Hidratar con alcohol: 70° (1), 80° (1), 96° (2), 100° (2) y luego en xilol 2 pasajes.
17. Realizar el montaje.

### Anexo III

#### Ficha dermatológica



Fecha:

HC N°

Código:

Derivado por: _____ Tel.: _____
Clínico: _____

<b>DATOS DEL PROPIETARIO:</b>
APELLIDO: _____
DIRECCION: _____ CIUDAD: _____ TEL: _____
<b>DATOS DEL PACIENTE:</b>
ESPECIE: ___ RAZA: _____ SEXO: ___ EDAD: _____ PELAJE: _____
<b>ANTECEDENTES DERMATOLÓGICOS:</b>
MOTIVO DE CONSULTA: _____

FECHA DE APARICIÓN DEL PROBLEMA: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_

¿ES TODO EL AÑO? SI \_\_\_ NO \_\_\_

SI ES ESTACIONAL, EMPEORA EN: PRIMAVERA VERANO OTOÑO INVIERNO

¿DONDE COMENZÓ EL PROBLEMA?: \_\_\_\_\_

¿HAY OTROS ANIMALES O PERSONAS AFECTADOS?: SI \_\_\_ NO \_\_\_

EN CASO AFIRMATIVO DESCRIBIR: \_\_\_\_\_

¿OBSERVÓ PULGAS?: SI \_\_\_ NO \_\_\_

HABITAT INTERIOR ( %): \_\_\_\_\_ HABITAT EXTERIOR ( %): \_\_\_\_\_

PRURITO: SI \_\_\_ NO \_\_\_ ¿CÓMO? \_\_\_\_\_

¿CUÁNDO? CONSTANTEMENTE \_\_\_ ESPORÁDICAMENTE \_\_\_ DE NOCHE \_\_\_\_\_

DIETA DEL ANIMAL: CASERA \_\_\_\_\_ BALANCEADO \_\_\_\_\_ MARCA \_\_\_\_\_

SE LE ADMINISTRO ALGUNA MEDICACIÓN ANTES: SI \_\_\_ NO \_\_\_

DESCRIBA RESULTADOS:

---

---

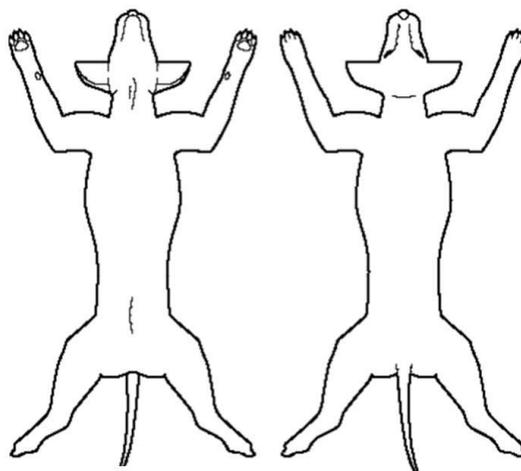
OTRAS ENFERMEDADES DEL ANIMAL: \_\_\_\_\_

DATOS DEL EXAMEN CLÍNICO: \_\_\_\_\_

---

---

---



COMPLEMENTARIOS SOLICITADOS:

---

---

DIAGNÓSTICO/S PRESUNTIVO/S:

---

---

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO:

---

---

TRATAMIENTO SUGERIDO:

---

---

---

PRÓXIMOS PASOS:

---

## ANEXO IV

### *Protocolo de anestesia local para toma de muestras con punch*

Las muestras tomadas bajo anestesia local serán de utilidad para zonas poco irrigadas, de fácil acceso o en animales dóciles y de buen carácter. De elección cuando las lesiones están presentes en la región del dorso-lomo, parrilla costal, región de la grupa y región de la cruz.

Pasos a seguir:

1º **Sujeción física:** al paciente se le colocará bozal y será sujetado por el propietario al momento de la toma de muestra. La misma se realiza en consultorio.

2º **Número de muestras:** la cantidad de muestras van de una a tres dependiendo de la cantidad de lesiones y la extensión de las mismas.

3º **Medidas de protección:** la toma de muestra se realiza con guantes de látex o nitrilo y ropa adecuada (ambo-guardapolvo)

4º **Selección de la zona de toma de muestra:** se toman muestras de zonas con y sin lesión. Para ello se rasura la zona si el animal presenta abundante pelo, se desinfecta la zona con digluconato de clorhexidina solución jabonosa al 4% y se realiza un círculo con fibra alrededor de la lesión.

5º **Colocación del anestésico local:** Se utiliza para la aplicación una jeringa de 1ml y aguja 21G o 25G. Se administra de forma subcutánea.

(Tabla 15)

**6° Toma de muestra:** se utiliza un punch de 6 u 8mm. Las muestras son colocadas en formol al 10% y remitidas al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. B Epstein. Al paciente de le realiza un punto de aproximación.

**Tabla 15:** anestésicos locales comúnmente utilizados en la toma de muestra.

<b>Agente a utilizar</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Frecuencia de administración</b>
Lidocaína 2%	1-4mg/kg	subcutánea	Única dosis
Bupivacaina 0,5%	0,25 mg/kg	subcutánea	Única dosis

## ANEXO V

### *Protocolo de anestesia general para toma de muestras con bisturí o punch*

Las muestras tomadas bajo anestesia general serán de utilidad para zonas muy irrigadas, dolorosas o cuando el animal sea muy inquieto o agresivo. De elección cuando las lesiones están presentes en mucosas, uniones mucocutáneas, miembros, cara (puente nasal, pabellones auriculares, nariz y regiones perioral y periocular).

**1º Sujeción física:** al paciente se le colocará bozal y será sujetado por el propietario para administrar la premedicación. La misma se realiza en consultorio o en una sala previa al quirófano.

**2º Número de muestras:** la cantidad de muestras van de una a tres dependiendo de la cantidad de lesiones y la extensión de las mismas.

**3º Medidas de protección:** la toma de muestra se realiza bajo normas de higiene y antisepsia del quirófano

**4º Selección de la zona de toma de muestra:** apertura de una vía endovenosa para aplicación de la anestesia/analgesia.

**4º Protocolo anestésico:** aplicación de la medicación anestésica. Para ello se rasura la zona, se desinfecta y se realiza un círculo con fibra alrededor de la lesión (Tabla 16).

**6º Toma de muestra:** se toman muestras de zonas con y sin lesión. Se utiliza un punch de 6 u 8mm. Las muestras son colocadas en formol al 10%

y remitidas al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. B Epstein.  
Al paciente de le realizaran los puntos de aproximación necesarios.

**Tabla 16:** diferentes medicaciones utilizadas durante el período anestésico y posterior al mismo, es decir, en el postquirúrgico.

<b>Agente a utilizar</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Frecuencia de administración</b>
Ketamina*	6,6-11mg/kg	Intramuscular o endovenosa	Según tiempos quirúrgicos
Xilacina*	1,1-2,2mg/kg	Intramuscular o endovenosa	Según tiempos quirúrgicos
Diazepam*	0,1-0,6mg/kg	endovenosa	Según tiempos quirúrgicos
Propofol*	3-6mg/kg	endovenosa	Según tiempos quirúrgicos
Tramadol**	1-4mg/kg	vía oral	8-12hs
Cefalexina **	20-30mg/kg	vía oral	12hs

\*Drogas a utilizar durante la toma de muestras. \*\* Drogas a utilizar durante el postquirúrgico. El uso del protocolo combinado de drogas a utilizar por el cirujano dependerá del paciente, tiempos quirúrgicos y extensión de la muestra.

## ANEXO VI

### *Técnica de inmunofluorescencia directa en parafina*

#### Procedimiento de marcación

1. Desparafinar: 2 pasajes en xilol durante 15 minutos cada uno a temperatura ambiente
2. Deshidratar: pasajes en alcohol durante 3 minutos cada uno:  
100° (2)  
96° (2)  
80° (1)  
70° (1)
- 3 Lavar 2 veces con PBS tween (solución de buffer fosfato + tween 20 0,005%: 50µl de tween 20 en 1000ml de PBS) durante 10 minutos
- 4 Recuperación antigénica: tripsina al 1% 45 minutos a 37°C
- 5 Lavar 2 veces con PBS tween durante 10 minutos
- 6 Bloqueo de las uniones inespecíficas: secar los vidrios e incubar con albúmina sérica bovina 1% durante 40 minutos a temperatura ambiente.
- 7 Escurrir y secar los vidrios
- 8 Ac primario: anti-IgG canina marcada con isotiocianato de fluoresceína (Anti-Dog IgG (whole molecule) Sigma®. Código F4012). Dilución 1/50 en cámara húmeda, Incubar 1 hora a 37° C
- 9 Lavar 3 veces con PBS tween 20 durante 10 minutos
- 10 Escurrir y secar los vidrios

- 11 DAPI: Incubar con DAPI (Invitrogen Life Technologies, Eurogene, OR, USA) (1:1000= 5µl DAPI en 995µl de PBS) en cámara húmeda 15 minutos.
- 12 Lavar con PBS tween 3 veces durante 10 minutos
- 13 Montar en medio de montaje acuoso

## Anexo VII

**Tabla 5:** razas más afectadas por grupo de enfermedad.

	<b>GRUPO</b>	<b>TOTAL</b>
<b>MESTIZOS</b>		
	CP	16
	LUPUS	7
	EASA	5
	EAI	3
<b>COCKER</b>		
	CP	2
	LUPUS	1
	EASA	0
	EAI	3
<b>PASTOR OVEJERO ALEMAN</b>		
	CP	6
	LUPUS	0
	EASA	1
	EAI	3
<b>COLLIE</b>		
	CP	5
	LUPUS	5
	EASA	0
	EAI	1
<b>LABRADOR RETRIEVER</b>		
	CP	3
	LUPUS	1
	EASA	1
	EAI	0
<b>OTRAS RAZAS</b>		
	CP	12
	LUPUS	5
	EASA	9
	EIA	4
<b>TOTAL</b>		<b>93</b>

**Tabla 6:** lesiones macroscópicas clasificadas por grupo de enfermedad.

<b>TIPO DE LESION</b>	<b>CP</b>	<b>LUPUS</b>	<b>EASA</b>	<b>TOTAL</b>
Pústulas	6	0	0	6
Vesículas	0	0	2	2
Erosiones	3	3	2	8
Úlceras	14	6	8	28
Costras	19	8	9	36
Alopecia	15	4	5	24
Descamación	6	3	0	9
Despigmentación	6	3	4	13
Hiperpigmentación	3	0	1	4
Hiperqueratosis	4	1	0	5
Eritema	5	1	4	10

**Tabla 7:** ubicación de las lesiones macroscópicas clasificadas por grupo de enfermedad.

<b>UBICACIÓN DE LAS LESIONES</b>	<b>CP</b>	<b>LUPUS</b>	<b>EASA</b>	<b>TOTAL</b>
Hocico/nariz	12	3	6	21
Plano nasal	22	7	4	33
Región Periorbital	22	5	1	28
Región Perilabial	4	1	-	5
Pabellones auriculares	10	-	1	11
Uniones MC*	18	8	5	31
Mucosas**	9	1	1	11

Uniones MC\* = unión mucocutánea: incluye boca, nariz y ano. Mucosa \*\*: incluye mucosa oral, nasal, anal, conjuntival y genital.

**Tabla 8:** lesiones microscópicas clasificadas por grupo de enfermedad y según su ubicación en la epidermis, unión D-E o dermis.

	<b>Lesiones Microscópicas</b>	<b>CP</b>	<b>LUPUS</b>	<b>EASA</b>	<b>TOTAL</b>
<b>EPIDERMIS</b>	Pústulas subcorneales e intragranulares	44	-	1	45
	Pústulas suprabasales	4	-	-	4
	Pústulas foliculares	14	-	1	15
	Vesículas	-	1	8	9
	Queratinocitos acantolíticos	19	-	-	19
	Acantosis	20	5	5	30
	Espongiosis	32	8	8	48
	Acantólisis	6	1	-	7
	Erosiones/ulceras	9	5	2	16
	Costras	14	3	-	17
	Hiperqueratosis	29	9	6	44
	Degeneración vacuolar de cel. Basales	6	14	3	23
	Exocitosis neutrofílica	3	1	2	6
	Hendidura suprabasal	5	1	-	6
<b>UNIO N D-E</b>	Separación D-E	17	7	11	35
	Desprendimiento de epidermis	6	4	4	14
<b>DERMIS</b>	Infiltrado inflamatorio leve	14	3	6	23
	Infiltrado inflamatorio moderado	18	3	2	23
	Infiltrado inflamatorio abundante	8	4	2	14
	Infiltrado liquenoide	7	8	4	19
	Apoptosis	6	11	3	20
	Incontinencia pigmentaria	11	11	5	27

**Tabla 10:** Piel normal: patrón hallado e intensidad de marcación de las diferentes lectinas.

LECTINA	Estrato basal		Estrato espinoso/granuloso		Estrato lúcido		Folic. pilosos	Dermis
	C	I	C	I	C	I		
PNA	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Con A	-	-	-	-	+	-	-	-
UEA 1	-	-	-	-	+	-	+	-
WGA	-	-	-	-	+/-	-	-	+
DBA	-	-	-	-	-	-	+	-
SBA	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-
RCA	++	++	++	++	+	+	++	+++

C: citoplasma; I: intercelular; S: superficial; P: profunda. -: reacción negativa; +/-: reacción dudosa; +, ++, +++: reacción positiva débil, moderada e intensa respectivamente.

**Tabla 11:** PE: patrón hallado e intensidad de marcación de las diferentes lectinas.

LECTINA	Estrato basal		Estrato espinoso/granuloso		Estrato lúcido		Folic. pilosos	Dermis
	C	I	C	I	C	I		
PNA	+++	+++	+++	+++	++	+	-	++
Con A	+/-	-	+	-	++	-	-	++
UEA 1	-	-	-	-	-	-	++	-
WGA	-	-	-	+	-	+	-	++
DBA	-	-	+/-	++	+/-	+	+	+/-
SBA	-	-	-	+++	-	+++	++	-
RCA	++	++	++	++	+	+	++	+++

C: citoplasma; I: intercelular; S: superficial; P: profunda. -: reacción negativa; +/-: reacción dudosa; +, ++, +++: reacción positiva débil, moderada e intensa respectivamente.

**Tabla 12:** PF: patrón hallado e intensidad de marcación de las diferentes lectinas.

LECTINA	Estrato basal		Estrato espinoso/granuloso		Estrato lúcido		Folic. pilosos	Dermis
	C	I	C	I	C	I		
PNA	++	+++	++	+++	+++	+++	++	-
Con A	-	-	+/-	-	+	-	-	+/-
UEA 1	-	-	++	++	++	+++	++	-
WGA	-	-	-	-	++	-	-	+
DBA	-	-	-	-	+	-	-	-
SBA	-	-	+++	+	+++	+	++	-
RCA	++	++	++	++	+	+	++	+++

C: citoplasma; I: intercelular; S: superficial; P: profunda. -: reacción negativa; +/-: reacción dudosa; +, ++, +++: reacción positiva débil, moderada e intensa respectivamente.

**Tabla 13:** LED: patrón hallado e intensidad de marcación de las diferentes lectinas.

LECTINA	Estrato basal		Estrato espinoso/granuloso		Estrato lúcido		Folic. pilosos	Dermis
	C	I	C	I	C	I		
PNA	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
Con A	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+
UEA 1	++	-	-	-	++	++	++	-
WGA	-	-	-	-	-	-	-	+
DBA	-	-	-	-	-	-	-	+
SBA	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++
RCA	++	++	++	++	+	+	++	+++

C: citoplasma; I: intercelular; S: superficial; P: profunda. -: reacción negativa; +/-: reacción dudosa; +, ++, +++: reacción positiva débil, moderada e intensa respectivamente.

## **Bibliografía**

- 1) Ansel J. 1990. Cytokine modulation of Keratinocyte cytokines. J. Invest. Dermatol. Müller & Kirk, 8: 548-550.
- 2) Balazs Mayanz V, Nolasco Espinosa, LR 2017. Actualización en lupus eritematoso cutáneo canino (LECC). Rev. Electrón. Vet. Vol. 18 N° 10
- 3) Bhang DH, Choi US, Jung YC, Kim MK, Choi EW, Seo KW, Kang MS. 2008. Topical 0.03% tacrolimus for treatment of pemphigus erythematosus in a Korea Jindo dog. J Vet Med Sci 70: 415-417.
- 4) Bedolla Alva M A, Salas Garrido G y Constantino Casas F. 2009. Diagnóstico inmunohistoquímico de dermatosis inmunomediadas en perros domésticos. Vet. Méx. vol. 40 (2): 181-189.
- 5) Bizikova P, Dean G A, Hashimoto T, Olivry T. 2012. Cloning and establishment of canine desmocollin-1 as a major autoantigen in canine pemphigus foliaceus. Elsevier Ltd. Veterinary Immunology and Immunopathology, 149:197–207.
- 6) Bizikova P, Linder KE, Wofford JA, Mamo LB, Dunston SM, Olivry T. 2015. Canine epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective study of 20 cases. Vet Dermatol 26: 441-450.
- 7) Bryden SL, White SD, Dunston SM, Burrows AK, Olivry T. 2005. Clinical, histopathological and immunological characteristics of exfoliative cutaneous lupus erythematosus in 25 German short-haired pointers. Veterinary Dermatology 16: 239–252.

- 8) Burge SM, Wilson CL, Dean D, Wojnarowska F. 1993. An immunohistological study of desmosomal components in pemphigus. *Brit J Dermatol* 128: 363-370.
- 9) Caldelari R, de Bruin A, Baumann D, Suter MM, Bierkamp C, Balmer V, Müller E. 2001. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 153: 823-834.
- 10) Campos Dominguez M, Suárez R, Ochaita PL. 2006. Métodos diagnósticos en las enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes. *Actas Dermosifiliogr* 97.
- 11) Campos-Granados CM. 2014. El sistema inmune de los mamíferos: las defensas del cuerpo. *Nutrición Animal Tropical* 8(1): 80-93.
- 12) Castagnaro M, Canese MG. 1991. Lectin Histochemistry on Squamous Metaplasia in Different Epithelial Tumors of Dogs. *Vet Pathol* 28:8-15.
- 13) De Bruin A, Müller E, Wyder M, Anhalt GJ, Lemmens P, Suter MM. 1999. Periplakin and envoplakin are target antigens in canine and human paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 40: 682-685.
- 14) Desantis S, Corriero A, Acone F, Zubani D, Cirillo F, Palmieri G, De Metrio G. 2003. Lectin histochemistry on the dorsal epidermis of the Breton dog. *Acta histochem.* 105(1) 73–79.

- 15)Ellebrecht CT, Payne AS. 2014. Plakophilins, desmogleins, and pemphigus: the tail wagging the dog. *J Invest Dermatol* 134: 874-876.
- 16)Elmore SA, Basseches J, Anhalt GJ, Cullen JM, Olivry T. 2005. Paraneoplastic pemphigus in a dog with splenic sarcoma. *Vet Pathol* 42: 88-91.
- 17)Favrot C, Dunston S, Deslandes J, Paradis M, Olivry T. 2002. Effect of substrate selection on indirect immunofluorescence testing of canine autoimmune subepidermal blistering diseases *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 66:26-30.
- 18)Femiano F. 2007. Pemphigus vulgaris: recent advances in our understanding of its pathogenesis. *Minerva Stomatol* 56: 215-223.
- 19)Geffner J. 2011. La respuesta inmunitaria: conceptos introductorios. In: Fainboim L, Geffner J. *Introducción a la inmunología humana*. 6<sup>th</sup> ed. Bs. As. Editorial. médica. Panamericana. 1:1-8.
- 20)Gibson, W T. 1991. Immunology of the hair follicle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 642:291.
- 21)Gonsalves-Hubers T. 2005. Pemphigus erythematosus in a chow chow. *Can Vet J* 46: 925-927.
- 22)Goo MJ, Park JK, Hong I, Yang H, Yuan D, Ki M, Han J, Ji A, Kim T, Williams BH, Jeong K. 2009. Discoid Lupus Erythematosus (DLE) in a Spitz Dog. *J. Vet. Med. Sci.* 70(6):633–635.
- 23)Green KJ, Simpson CL. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 127: 2499-2515.

- 24)Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. 2005. Skin diseases of the dog and cat. In: Clinical and histopathologic diagnosis. 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Publishing. p13-43.
- 25)Hargis AM, Myers S. 2017. The integument. In: Zachary JF, McGavin MD (eds). Pathologic basis of veterinary disease. 6<sup>th</sup> ed. St. Louis, Missouri: Elsevier. p 1009-1146.
- 26)Hill PB, Boyer P, Lau P, Rybnicek J, Hargreaves J, Olivry T. 2008. Epidermolysis bullosa acquisita in a Great Dane. J Small Anim Pract, 49(2): 89-94.
- 27)Honda R, Nishifuji K, Olivry T, White S D, Momoi Y, Iwasaki T. 2004. Detection of circulating autoantibodies using living keratinocyte staining on MCA-B1 method in dogs with pemphigus foliaceus. Elsevier Ltd. Veterinary Science, 77: 105-113.
- 28)Ide K, Yamamoto W, Sato M, Yabuzoe A, Iwasaki T and Nishifuji K. 2010. Expression Analysis of Desmosomal Components of the Novel Canine Epidermal Keratinocyte Cell Line (MSCEK). J. Vet. Med. Sci., vol. 72 (11): 1479–1482.
- 29)Ihrke PJ, Stannard AA, Ardans AA, Griffin CE. 1985. Pemphigus foliaceus in dogs: a review of 37 cases. J Am Vet Med Assoc 186: 59-66.
- 30)Iwasaki T, Olivry T, Lapierel JC, Chan S, Peavey C, Liu YY, Jones JCR, IHRKEA PJ, Woodley DT 1995 Canine Bullous Pemphigoid (BP): Identification of the 180-kd Canine BP Antigen by Circulating Autoantibodies. Vet Pathol. 32:387-393.

- 31)Iwasaki T, Shimizu M, Obata H, Ogata M, Nagata M, Yanai T, Kitagawa H and Sasaki Y. 1996. Effect of Substrate on Indirect Immunofluorescence Test for Canine Pemphigus Foliaceus. *Vet Pathol* 33: 332.
- 32)Iwasaki T, Isaji M, Yanai T, Kitagawa H, Sasaki Y. 1997. Immunomapping of basement membrane zone macromolecules in canine salt-split skin. *J Vet Med Sci.* 59(5):391-3.
- 33)Jackson HA. 2004. Eleven cases of vesicular cutaneous lupus erythematosus in Shetland sheepdogs and rough collies: clinical management and prognosis. *Veterinary Dermatology* 15: 37–41.
- 34)Kawarai S, Hisasue M, Matsuura S, Ito T, Inoue Y, Neo S, Fujii Y. 2015. Canine pemphigus foliaceus with concurrent immune-mediated thrombocytopenia. *J Am Anim Hosp Assoc* 51: 56-63.
- 35)Krmptic CM, Barbeito CG, Laube FA, Torres MA. Sistema tegumentario. En: Barbeito CG y Dissler ME. *Introducción a la histología veterinaria.* (en prensa). La Plata, EDULP. Cap. 22.
- 36)Kuhl KA, Shofer FS, Goldschmidt MH. 1994. Comparative Histopathology of Pemphigus Foliaceus and Superficial Folliculitis in the Dog. *Vet Pathol* 31:19.
- 37)Larsson C. 2005. Wandering through the Autoimmune Dermatoses: Pemphigus Complex. In: *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association.* Mexico City, Mexico. En: <http://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pId=11196&meta=Generic&id=3854248>.

- 38) Lewis R M, Picut C A. Veterinary Clinical Immunology. Lea & Febiger, Philadelphia. Müller & Kirk, 8:631-633. 1989.
- 39) Lloyd, D H, Garthwaite G. 1982. Epidermal structure and surface topography of canine skin. Res Vet Sci 33 (1) 99-104.
- 40) Massone AR, Itagaki S, Doi K, Gimeno EJ. 1991. Lectin histochemical study on normal and paratuberculosis-affected bovine ileum. J Vet Med Sci 53:761-763.
- 41) Mauldin EA, Peters-Kennedy J. 2016. Integumentary system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer NC (eds). Pathology of domestic animals. 6<sup>th</sup> ed. St. Louis, Missouri: Elsevier. p 509-736.
- 42) Meyer W, Tsukise A. 1995. Lectin histochemistry of snout skin and foot pads in the wolf and the domesticated dog (Mammalia: Canidae). Ann Anat 177 (1):39-49.
- 43) Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. 2014. Müller & Kirk: dermatología en pequeños animales. 3<sup>o</sup> ed. Buenos Aires: Intermédica. p. 478-522.
- 44) Miragliotta V, Coli A, Ricciardi MP, Podesta A, Abramo F. 2005. Immunohistochemical analysis of the distribution of desmoglein 1 and 2 in the skin of dogs and cats. Am J Vet Res 66: 1931-1935.
- 45) Miyazawa M, Kimura T, Itagaki S. 1994. Lectin histochemistry on the skin of hairless descendants of Mexican hairless dogs. Tissue and cell 26 (1): 19-17.
- 46) Müller GH, Kirk GH, Scott DW. 1997. Dermatología en pequeños animales. Intermédica. 8: 549-550.

- 47)Müller, GH. Small Animal Dermatology, IV. W. B. Saunders Co., Philadelphia. Müller & Kirk, 1:23-24. 1989.
- 48)Nishifuji K, Olivry T, Ishii K, Iwasaki T, Amagai M. 2007. IgG autoantibodies directed against desmoglein 3 cause dissociation of keratinocytes in canine pemphigus vulgaris and paraneoplastic pemphigus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 117: 209–221.
- 49)Nishifuji K, Tamura K, Konno H, Olivry T, Amagai M, Iwasaki T. 2009. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of circulating IgG autoantibodies against canine desmoglein 3 in dogs with pemphigus. *Vet Dermatol* 20: 331-337.
- 50)Olivry T, Savary KCM, Murphy KM, Dunston SM, Chen M. 1999a. Bullous systemic lupus erythematosus (type I) in a dog *Veterinary record* 145: 165-169.
- 51)Olivry T, Chan LS, Xu L, Chace P, Dunston SM, Fahey M, Marinkovich MP. 1999b. Novel feline autoimmune blistering disease resembling bullous pemphigoid in humans: IgG autoantibodies target the NC16A ectodomain of type XVII collagen (BP180/BPAG2). *Vet Pathol* 36: 328-335.
- 52)Olivry T, Alhaidari Z, Ghohestani RF. 2000a. Anti-plakin and desmoglein autoantibodies in a dog with pemphigus vulgaris. *Vet Pathol* 37: 496-499.
- 53)Olivry T, Dunston SM, Fahey M, Nguyen N, Marinkovich MP. 2000b. Autoantibodies against the processed ectodomain of collagen XVII

- (BPAG2, BP180) define a canine homologue of linear IgA disease of humans. *Vet Pathol* 37: 302-309.
- 54) Olivry T, Chan LS. 2001. Autoimmune blistering dermatoses in domestic animals. *Clin Dermatol* 19: 750-760.
- 55) Olivry T, Jackson HA. 2001a. An alopecic phenotype of canine pemphigus vulgaris? *Brit J Dermatol* 145:176-178.
- 56) Olivry T, Jackson HA. 2001b. Diagnosing new autoimmune blistering skin diseases of dogs and cats. *Clin Tech Small An P* 16: 225-229.
- 57) Olivry T, Dunston SM, Schachter M, Xu L, Nguyen N, Marinkovich MP, Chan LS. 2001. A spontaneous canine model of mucous membrane (cicatricial) pemphigoid, an autoimmune blistering disease affecting mucosa and mucocutaneous junctions. *J Autoimmun* 16: 411-421.
- 58) Olivry T, Dunston SM, Zhang G, Ghohestani RF. 2002. Laminin-5 is targeted by autoantibodies in feline mucous membrane (cicatricial) pemphigoid. *Vet Immunol Immunop* 88:123-129.
- 59) Olivry T, Joubeh S, Dunston SM, Nishiyama T, Ghohestani RF. 2003. Desmoglein-3 is a target autoantigen in spontaneous canine pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 12: 198-203.
- 60) Olivry T. 2006. A review of autoimmune skin diseases in domestic animals: I – Superficial pemphigus. *European Society of Veterinary Dermatology*. 17: 291–305.

- 61)Olivry T, LaVoy A, Dunston SM, Brown RS, Lennon EM, Warren SJ, Prisayanh P. 2006. Desmoglein-1 is a minor autoantigen in dogs with pemphigus foliaceus. *Vet Immunol Immunop* 110: 245-255.
- 62)Olivry T, Dunston S M, Walker R H, Alhaidari Z, Messinger L and Liu Z. 2008. Investigations on the nature and pathogenicity of circulating antikeratinocyte antibodies in dogs with pemphigus foliaceus. *ESVD and ACVD*. 20: 42–50.
- 63)Olivry T and Linder K E. 2009. Dermatoses affecting desmosomes in animals: a mechanistic review of acantholytic blistering skin diseases. *Veterinary Dermatology*, 20: 313–326.
- 64)Olivry T, Dunston SM, Walker RH, Alhaidari Z, Messinger L, Liu Z. 2009. Investigations on the nature and pathogenicity of circulating antikeratinocyte antibodies in dogs with pemphigus foliaceus. *Vet Dermatol* 20: 42-50.
- 65)Olivry T, Dunston SM. 2010. Usefulness of collagen IV immunostaining for diagnosis of canine epidermolysis bullosa acquisita. *Vet Pathol* 47: 565-568.
- 66)Olivry T, Bizikova P, Dunston SM, Bond R, Halliwell R, Loeffler A, Pucheu-Haston CM, Chen M, Marinkovich MP. 2010. Clinical and immunological heterogeneity of canine subepidermal blistering dermatoses with anti-laminin-332 (laminin-5) auto-antibodies. *Vet Dermatol*. (4):345-57.

- 67)Olivry T. 2012. Estructura de los Desmosomas en los Queratinocitos Epidérmicos y Desmosomas y Queratinocitos: Patología Animal Comparada. University of North Carolina school of Medicine. USA.
- 68)Olivry T, Rossi MA, Banovic F, Linder KE 2015. Mucocutaneous lupus erythematosus in dogs (21 cases). *Vet. Dermatol* 26: 256–e55.
- 69)Paolicchi F A, Cipolla A L, Casaro A P, Massone A R, Itagaki S, Gimeno EJ. 1995. Lectin histochemical study on the reproductive tract in normal and *Brucella ovis*- infected rams. *J Vet Med Sci*, 57: 935-938.
- 70)Parra-Medina R y Polo JF. 2017. Artículo de revisión Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina (IF-P). Una mirada desde la patología quirúrgica. *Repert Med Cir.* 4: 202-207.
- 71)Peters J, Scott D W, Erb H N and Miller Jr WH. 2007. Comparative analysis of canine dermatophytosis and superficial pemphigus for the prevalence of dermatophytes and acantholytic keratinocytes: a histopathological and clinical retrospective study. *Journal compilation ESVD and ACVD*, 18: 234–240.
- 72)Shinya K, Nomura K, Wada S, Morioka H, Umemura T. 1996. Pemphigus foliaceus with typical histological and immunohistological findings in a dog. *J Vet Med Sci* 58: 815-817.
- 73)Spindle V, Waschke J. 2018. Pemphigus—A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. *Front Immunol* 9: 136.

- 74)Steeves E B, Chelack B J, Clark E G, Haines DM. 2002. Altered Immunohistochemical Staining Desmoglein in Skin Biopsies in Canine Pemphigus Foliaceus. *J Vet Diagn Invest*, 14: 53–56.
- 75)Suter MM, Augustin-Voss HG, Pantino DM, Flanders JA, Varvayanis M. 1991. Differentiation-dependent Expression of Lectin Binding Sites on Normal and Neoplastic Keratinocytes In Vivo and In Vitro. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* Vol. 39. (8) pp. 1103-1112.
- 76)Tizard I. 2019. *Inmunología Veterinaria*. 10<sup>ma</sup> ed. Elsevier España p. 234-246.
- 77)Tham HL, Olivry T, Linder KE, Bizikova P. 2016 Mucous membrane pemphigoid in dogs: a retrospective study of 16 new cases. *Vet Dermatol* 27: 376-394.
- 78)Vaughan DF, Clay E, Hosgood GL, Bernstein JA. 2010. Clinical and histopathological features of pemphigus foliaceus with and without eosinophilic infiltrates: a retrospective evaluation of 40 dogs. *Vet Dermatol* 21:166-174.
- 79)Wang P, Zangerl B, Werner P, Mauldin EA, Casal ML. 2011. Familial cutaneous lupus erythematosus (CLE) in the German shorthaired pointer maps to CFA18, a canine orthologue to human CLE. *Immunogenetics* 63:197–207.
- 80)Waschke J. 2008. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*. 130:21–54.

- 81) Wiemelt SP, Goldschmidt MH, Greek JS, Jeffers JG, Wiemelt AP, Mauldin EA 2004. A retrospective study comparing the histopathological features and response to treatment in two canine nasal dermatoses, DLE and MCP. *Vet Dermatol* 15, 341–348.
- 82) Yabuzoe A, Nishifuji K, Sekiguchi M, Shimizu A, Momoi Y, Ishiko A and Iwasaki T 2008. Neutrophils Contact to Plasma Membrane of Keratinocytes Including Desmosomal Structures in Canine Pemphigus Foliaceus. *J. Vet. Med. Sci.* vol. 70 N°8: 807–812.
- 83) Yabuzoe A, Shimizu A, Nishifuji K, Momoi Y, Ishiko A, Iwasaki T 2009. Canine pemphigus foliaceus antigen is localized within desmosomes of Keratinocyte. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127:57–64.
- 84) Yager, J A. The skin as an immune organ. Pergamon Press, New York. Müller & Kirk, 8:549-551. 1993.